

**Lucila de Campos**

**Teste de ativação de basófilos como biomarcador para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade aos taxanos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior

**São Paulo  
2022**

**Lucila de Campos**

**Teste de ativação de basófilos como biomarcador para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade aos taxanos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior

**São Paulo  
2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Lucila de  
Teste de ativação de basófilos como biomarcador  
para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade  
aos taxanos / Lucila de Campos. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Alergia e Imunopatologia.  
Orientador: Pedro Francisco Giavina-Bianchi  
Junior.

Descritores: 1.Anafilaxia 2.Basófilos  
3.Biomarcadores 4.Hipersensibilidade imediata  
5.Taxoïdes 6.Teste de ativação de basófilos  
7.Diagnóstico

USP/FM/DBD-147/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

### **Dedicatória**

Ao Dr Wilson Tartuce Aun, que me apoiou e orientou em todos os passos durante minha trajetória profissional da residência médica ao doutorado.

Ao meu filho Henrique que me acompanhou com tanta coragem nesta jornada internacional e que me inspira a cada dia a ser uma pessoa melhor.

## **Agradecimentos**

A realização desta tese de doutorado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não teria se tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Ao Professor Pedro Giavina-Bianchi pela sua orientação, amizade, total apoio e disponibilidade e todo conhecimento compartilhado comigo.

Ao professor Jorge Kalil, pela inspiração e por todo tempo dedicado a me apoiar cientificamente e pessoalmente em minha jornada em Boston, assim como a sua esposa Liana Kalil, grande apoiadora e incentivadora nos momentos mais difíceis.

A Professora Mariana Castells, médica e cientista brilhante que me recebeu no Serviço de Alergia e Imunologia do Brigham and Women's Hospital/Harvard Medical School e me proporcionou, além de toda orientação e ensino, esta incrível e única experiência internacional.

Aos colegas do laboratório do Brigham and Women's Hospital Rafael Polidoro e Felipe Lellis, que além de me inspirarem como cientistas foram incansáveis na missão de compartilhar o conhecimento sobre citometria de fluxo, me ensinar e me apoiar em todos os momentos. Sem vocês não teria sido possível.

As colegas Shree Acharya, assistente do laboratório, Donna-Marie Lynch, enfermeira do serviço de dessensibilização e Sahar Hamadi, assistente do serviço, que compartilharam seus conhecimentos e durante um ano me apoiaram no dia a dia da execução de minha pesquisa.

Aos colegas e mestres do ambulatório de alergia a medicamentos da Faculdade de Medicina da USP, Marcelo Aun, Rosana Agondi, Abílio Mota, Anna Carolina D'Onófrío,

Nathália Kelmann, Priscila Yamada, Laila Sabino Garro e Rafael Bonamichi, minha eterna amizade.

A todos os funcionários do serviço de Alergia e Imunologia Clínica da faculdade de Medicina da USP, vocês são incansáveis.

A todos os residentes que passaram pelo serviço nestes cinco anos, que me motivaram a aprender e ensinar, impossível citar todos os nomes, porém estarão sempre comigo.

Aos pacientes, que mesmo passando por grandes adversidades encontraram forças para fazer parte desta pesquisa com o único intuito de ajudar ao próximo e a ciência, e me emocionaram com sua coragem.

Ao Marcos S Soares que foi incansável nas noites sem dormir, palavras de incentivo e ajuda na elaboração de planilhas infinitas, mesmo sem serem de sua área.

A equipe de Bibliotecárias da Faculdade de Medicina da USP pelo apoio e orientação.

Ao meu pai (*in memoriam*), minha mãe e meus avós (*in memoriam*), exemplos de força, resiliência e coragem, que batalharam sem medir esforços e me proporcionaram a oportunidade de chegar até aqui, minha eterna gratidão.

### **Normalização adotada**

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.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

## Sumário

1. Introdução	13
1.1. Conceitos em Alergia e Imunologia	13
1.1.1. Hipersensibilidade	
1.1.2. Alergia	13
1.1.3. Atopia	13
1.1.4. Anafilaxia	13
1.2. Reações Adversas a Medicamentos (RAMs)	15
1.3. Reações de hipersensibilidade a quimioterápicos	16
1.3.1. Classificação e sintomas das reações de hipersensibilidade a quimioterápicos	17
1.3.2. Diagnóstico das reações de hipersensibilidade a quimioterápicos	19
1.3.3. Tratamento das reações de hipersensibilidade a quimioterápicos	20
1.4. Reações de Hipersensibilidade imediata a Taxanos	21
1.4.1. Paclitaxel	21
1.4.2. Docetaxel	23
1.4.3. Nab-Paclitaxel	23
1.4.4. Cabazitaxel	24
1.5. Mecanismos fisiopatológicos e diagnóstico das Reações de Hipersensibilidade imediata a Taxanos	24
1.6. Teste de ativação de basófilos (BAT)	27
2. Pergunta científica	30
3. Objetivo	31
4. Métodos	32
4.1. Casuística e delineamento	32
4.1.1. Critérios de inclusão	33



4.1.2. Critério de Exclusão	33
4.1.3. Classificação das reações de hipersensibilidade	
Imediata	33
4.2. Teste de Ativação de Basófilo	33
4.3. Análise Estatística	35
5. Resultados	36
5.1. Caracterização das amostras	36
5.2. Teste de Ativação de Basófilos	40
6. Discussão	47
7. Conclusões	51
8. Referências Bibliográficas	52

## Resumo

### **Teste de ativação de basófilos como biomarcador para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade aos taxanos**

**Introdução:** Os taxanos são quimioterápicos amplamente utilizados. A sua administração está associada a reações de hipersensibilidade imediata em até 9% dos pacientes. Biomarcadores para diagnóstico precoce e melhor compreensão dos mecanismos subjacentes a essas reações são essenciais para definir a melhor estratégia de tratamento.

**Métodos:** O objetivo deste estudo é avaliar o BAT como no diagnóstico de pacientes com reações anafiláticas aos taxanos. Foram selecionados pacientes com anafilaxia após uso de taxanos (n = 15) avaliados por meio de história clínica, teste cutâneo e BAT. O BAT foi avaliando-se a expressão de CD203c e CD63 nos basófilos. O teste também foi realizado em 8 voluntários saudáveis. O limiar para definir os testes “positivos” e “negativos” foi calculado usando a curva ROC (*receiver operator characteristic curve*).

**Resultados:** O BAT foi positivo para CD203c em 8 de 15 pacientes e para CD63 em 4 de 15 pacientes, e em 1 de 8 controles. A sensibilidade para CD203c foi de 53% e a especificidade de 87% (área sob a curva de 0,66, p = 0,19%) e para CD63 foi de 33% e 87% (área sob a curva de 0,6, p = 0,4). Na análise de subgrupo de pacientes com testes cutâneos positivos (11 pacientes), CD203c foi positivo em 6 pacientes (sensibilidade 54,5% e especificidade 87,5%) e CD63 em 5 pacientes (sensibilidade 45% e especificidade 75%).

**Conclusões:** O BAT como ferramenta diagnóstica para reações de hipersensibilidade imediata a taxanos pode ser usado em pacientes com fenótipos e endótipo selecionados, principalmente que apresentaram reações graves ou quando o diagnóstico não pode ser estabelecido com o teste cutâneo. A expressão aumentada de CD203c foi mais frequente do que CD63 nos pacientes com resultados positivos, e a sensibilidade deste biomarcador aumenta no subgrupo de pacientes com teste cutâneo positivo, ou seja, pacientes com endótipo de reação IgE mediada.

## **Abstract**

### **Basophil activation test as a biomarker of the diagnosis of hypersensitivity reactions to taxanes**

**Introduction:** Taxanes are widely used chemotherapeutic agents. Their administration is associated with immediate hypersensitivity reactions in up to 9% of patients. Finding biomarkers for the early diagnosis of hypersensitivity and better understanding the mechanisms underlying these reactions are essential to define the best treatment strategy.

**Methods:** This study aimed to evaluate the usefulness of the basophil activation test (BAT) in the diagnosis of patients with anaphylactic reactions to taxanes. Fifteen patients with anaphylaxis to taxanes were evaluated by clinical history, skin test, and BAT. BAT was used to evaluate the expression of CD203c and CD63 in basophils. The test was also performed on eight healthy volunteers. The threshold for defining the positive and negative tests was calculated using the receiver operating characteristic curve (ROC).

**Results:** BAT was positive for CD203c in eight of 15 patients and for CD63 in four of 15 patients and one control. The sensitivity for CD203c was 53%, and the specificity was 87% (area under the curve 0.66;  $p = 0.19\%$ ). For CD63, these were 33% and 87% (area under the curve 0.6;  $p = 0.4$ ). In the subgroup analysis of patients with positive skin tests (11 patients), CD203c was positive in six patients (sensitivity 54.5% and specificity 87.5%), and CD63 was positive in five patients (sensitivity 45% and specificity 75%).

**Conclusions:** BAT as a diagnostic tool for immediate hypersensitivity reactions to taxanes may be relevant in patients with selected phenotypes and endotypes, especially those with severe reactions or when the diagnosis cannot be established by the skin test. Increased expression of CD203c was more frequent than of CD63 in patients with positive results, and the sensitivity of this biomarker was higher in patient sub-group with positive skin tests, i.e., patients with IgE-mediated endotypes.

## **Lista de Siglas**

APC: *allophycocyanin*

BWH: Brigham and Women's Hospital

BV: "*Brilliant Violet*"

DFCI: Dana-Farber Cancer Institute

DRESS: reação a drogas com eosinofilia e sintomas sistêmicos

FcεRI: Receptores de alta afinidade para IgE

FITC: isotiocionato de fluoresceína

IgE: Imunoglobulina E

IL-6: Interleucina-6 (IL-6)

NET: necrólise epidérmica tóxica

PE: ficoeritrina

RAMs: Reações Adversas a Medicamentos

ROC: *Receiver operator characteristic curve*

RH: Reações de hipersensibilidade

RHMI: Reações de hipersensibilidade aos medicamentos imediatas

WAO: Organização Mundial de Alergia

## **Teste de ativação de basófilos como biomarcador para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade aos taxanos**

### 1. Introdução

#### 1.1. Conceitos em alergia e imunologia

Utilizaremos os conceitos e nomenclaturas em alergia e imunologia revisadas para uso global no Relatório do Comitê de Revisão de Nomenclatura da Organização Mundial de Alergia (WAO) em outubro de 2003 (JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004).

##### 1.1.1. Hipersensibilidade

O termo hipersensibilidade é usado para descrever sinais ou sintomas reprodutíveis, iniciados pela exposição a um estímulo definido, em uma dose tolerada por pessoas normais (JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004). As reações de hipersensibilidade (RH) aos medicamentos podem ser classificadas como imediatas e não imediatas, com base no intervalo entre a exposição ao medicamento e o início das manifestações clínicas. Esta classificação correlaciona-se com o mecanismo fisiopatológico envolvido na reação e com manifestações clínicas específicas. As RH aos medicamentos imediatas (RHMI) ocorrem em até 1-6 horas após a administração do medicamento, envolvem a desgranulação de mastócitos e basófilos, e são caracterizadas por urticária, angioedema, rinoconjuntivite, broncoespasmo e anafilaxia (LEVINE, 1966).

##### 1.1.2. Alergia

Alergia é uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos específicos. A alergia pode ser mediada por anticorpos ou por células. Na maioria dos pacientes com sintomas respiratórios ou gastrointestinais, o anticorpo

mediador é uma imunoglobulina E (IgE), e pode-se dizer que esses pacientes têm uma alergia mediada por IgE. Na alergia não-IgE mediada, a inflamação pode ser mediada por anticorpos de outros isotipos e/ou por linfócitos específicos a determinado alérgeno, como na dermatite de contato alérgica. Um alérgeno é um antígeno que causa doenças alérgicas (JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004).

### 1.1.3. Atopia

Atopia é uma tendência pessoal ou familiar de se tornar sensibilizado e produzir anticorpos IgE em resposta a exposições a alérgenos. O termo atopia deve ser reservado para descrever a predisposição genética para se tornar sensível a alérgenos que ocorrem comumente no ambiente e aos quais todos estão expostos, mas aos quais a maioria das pessoas não produz uma resposta de anticorpo IgE prolongada. Além disto, o termo atopia somente pode ser usado quando a sensibilização por IgE for documentada, seja pela presença de anticorpos IgE específicos no soro ou por teste cutâneo de leitura imediata positivo. Entretanto, um teste cutâneo positivo ou a presença de anticorpo IgE para um alérgeno menos comum não é um critério definitivo para atopia, especialmente se a exposição ao alérgeno não for em dose baixa, não ocorrer frequentemente, ou não ocorrer através das mucosas. Exemplos típicos são a alergia a ferroadas de himenópteros, a anafilaxia a alimentos e a maioria das alergias a medicamentos. Esses pacientes devem ser referidos como teste cutâneo positivo e sensibilizados por IgE, respectivamente (JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004).

### 1.1.4. Anafilaxia

A anafilaxia, segundo a WAO, é uma RH imediata sistêmica ou generalizada, que é grave, rápida e que pode levar à morte (SIMONS; ARDUSSO; DIMOV; EBISAWA *et al.*, 2013). Vale notar que o termo correto para definir esta reação é “anafilaxia” e não “choque anafilático”, tendo em vista que o “choque” nem sempre está presente em pacientes com anafilaxia. O termo anafilaxia alérgica deve ser usado quando a reação é mediada por um mecanismo imunológico específico, por exemplo, IgE, IgG ou formação de imunocomplexo com ativação do complemento. A anafilaxia por qualquer causa não

imunológica deve ser referida como anafilaxia não alérgica.(JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004)

## 1.2. Reações Adversas a Medicamentos (RAMs)

Reações adversas a medicamentos (RAMs) são reações indesejáveis e não intencionadas que ocorrem devido ao uso de uma determinada medicação, para fins terapêuticos, profiláticos ou diagnósticos. Dentre as RAMs, destacam-se as RHM, que representam 5 a 10 % destas reações (DEMOLY; ADKINSON; BROCKOW; CASTELLS *et al.*, 2014; RIEDER, 2009). A WAO define as RHM como qualquer reação iniciada por um estímulo definido e que possa ser reproduzida em contatos subsequentes com o medicamento (JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004). Estas ocorrem de forma imprevisível, podendo ser fatais, como no caso das anafilaxias. Elas podem ser classificadas em imediatas e tardias, sendo as imediatas as que aparecem em até seis horas após a administração da medicação suspeita e as não imediatas ou tardias após seis horas (DEMOLY; ADKINSON; BROCKOW; CASTELLS *et al.*, 2014; DEMOLY; CASTELLS, 2018).

O termo alergia a medicamentos deve ser usado quando é demonstrada a existência de mecanismos imunológicos específicos envolvidos, sejam eles mediados por anticorpos ou por linfócitos. O tempo após o qual se inicia uma reação, imediato ou tardio, descreve não somente o início dos sintomas como indica o provável mecanismo imunológico responsável, ou seja, mediado por IgE, ou mediado por anticorpos de outros isotipos ou linfócitos, respectivamente. (JOHANSSON; BIEBER; DAHL; FRIEDMANN *et al.*, 2004; P. DEMOLY, 2020). Os basófilos, assim como os mastócitos, possuem receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) em suas membranas celulares, onde as IgEs circulantes podem se ligar. Nas RH alérgicas mediadas por IgE, quando um determinado alérgeno promove ligação cruzada entre duas IgEs que estão unidas aos receptores FcεRI dos basófilos/mastócitos, é desencadeada uma cascata de reações que culmina na liberação de mediadores inflamatórios pré-formados e neoformados. Esta desgranulação não ocorre somente em reações de hipersensibilidade tipo I, mas também pode ser desencadeada por outros estímulos como pela ativação direta dos basófilos e mastócitos, ou através de formação de complemento. Uma vez desencadeadas, as reações

de hipersensibilidade levam ao aparecimento de sintomas que podem envolver múltiplos órgãos e sistemas como a pele, sistema respiratório, cardiovascular e gastrointestinal, podendo levar a anafilaxia e morte do paciente (CASTELLS, M. C., 2017; DEMOLY; ADKINSON; BROCKOW; CASTELLS *et al.*, 2014). Quando não existe mecanismo imunológico demonstrado, a reação deve ser denominada de reação de hipersensibilidade não-alérgica.

### 1.3. Reações de hipersensibilidade a quimioterápicos

O câncer é hoje, no Brasil e no mundo, um problema de saúde pública, cujo tratamento, controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas até as menos favorecidas. A mais recente estimativa mundial, do ano de 2018, mostra que ocorreram, no mundo, 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos. Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é de 450 mil casos novos de câncer, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, sendo que os mais incidentes serão os cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

Graças aos recentes avanços no tratamento do câncer, um número cada vez maior de agentes antineoplásicos está disponível para o seu tratamento e a expectativa de vida dos pacientes apresentou um aumento significativo nos últimos anos. Consequentemente as reações adversas a estes agentes também aumentaram dramaticamente.

As evidências demonstram que, na prática médica, a maioria dos pacientes que apresentam reações de hipersensibilidade a agentes antineoplásicos são classificados como alérgicos e muitas vezes são privados de receber o tratamento de primeira-escolha para sua enfermidade, com impacto negativo na qualidade de vida destes pacientes e na sobrevivência global. O diagnóstico preciso das RH é essencial para evitar a troca desnecessária do medicamento, assim como para embasar a indicação de procedimento de dessensibilização, abordagem por meio do qual os pacientes passam a tolerar a medicação que antes desencadeava reações.

A incidência das RH a agentes quimioterápicos varia de acordo com o agente utilizado, sendo as reações a platinas e aos taxanos as mais frequentes (CASTELLS, 2008; CASTELLS; TENNANT; SLOANE; HSU *et al.*, 2008). As reações de hipersensibilidade



a platinas ocorrem normalmente entre a sétima e a oitava exposições, após um período de sensibilização, e os sintomas são compatíveis com os sintomas de uma reação IgE mediada com ativação mastocitária. Quanto maior o número de doses administradas, maior a incidência das reações a platinas, variando de 1 a 16% nas seis primeiras infusões e chegando a 27% entre a sétima e oitava infusão (CAIADO; PICARD, 2014; MARKMAN; KENNEDY; WEBSTER; ELSON *et al.*, 1999). Já as RH a taxanos (paclitaxel e docetaxel) ocorrem em sua maioria na primeira ou na segunda exposição, minutos após o início da infusão. A incidência de RH ao paclitaxel no início de sua utilização foi muito alta, chegando a 40% e acarretando óbitos durante os estudos clínicos. Com o uso de esquemas de pré-medicação com dexametasona associada a outros agentes como anti-histamínicos, a incidência das reações de hipersensibilidade caiu para 10% dos pacientes que recebem paclitaxel e 5% dos pacientes que recebem docetaxel (CASTELLS, 2008; MARKMAN; KENNEDY; WEBSTER; KULP *et al.*, 2000; PICARD; CASTELLS, 2015; PICARD; MATULONIS; CASTELLS, 2014; WEISS; DONEHOWER; WIERNIK; OHNUMA *et al.*, 1990). Os sintomas apresentados são compatíveis com os de uma reação anafilática, acrescidos muitas vezes de dores nas costas, abdominais e pélvicas. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nestas reações ainda não estão totalmente esclarecidos e serão tema de discussão nesta tese (PICARD; CASTELLS, 2015).

As reações tardias, tipo III (doença do soro) e tipo IV, são menos frequentes, sendo que as do tipo IV, em sua maioria, são de gravidade moderada com presença de exantema máculo-papular. Estas reações podem surgir de 12 horas a várias semanas após a exposição ao agente ofensivo. Pacientes com diagnósticos de reações tardias graves como Stevens Johnson, necrólise epidérmica tóxica (NET) ou reação a drogas com eosinofilia e sintomas sistêmicos (DRESS) apresentam contra-indicação absoluta para dessensibilização (CASTELLS, 2008).

### 1.3.1 Classificação e sintomas das reações de hipersensibilidade a quimioterápicos

A classificação das RH a antineoplásicos em relação ao tipo de reação e ao nível de gravidade da reação são fundamentais para definição da conduta terapêutica. Embora a classificação por Gell e Coombs seja a utilizada para especificar o mecanismo de

hipersensibilidade de uma reação alérgica, muitas vezes a classificação e o diagnóstico das RH a agentes antineoplásicos são bastante desafiadores, devido a apresentação atípica de sintomas, o momento do aparecimento das reações e os mecanismos envolvidos (GIAVINA-BIANCHI; PATIL; BANERJI, 2017). Novas abordagens, para uma melhor compreensão das reações a esta classe de medicamentos, envolvem a caracterização das reações imediatas pelo fenótipo, endótipo e biomarcadores. Os fenótipos são definidos pela apresentação clínica e os endótipos referem-se aos mecanismos celulares e moleculares envolvidos, definidos por biomarcadores, como testes cutâneos, triptase, entre outros. Assim sendo, as reações imediatas podem ser classificadas como IgE mediadas, tempestade de citocinas (*citokine storm*) e reações mistas, e a tabela 1 resume os principais sintomas (fenótipos) relacionados aos mecanismos imunológicos envolvidos (endótipos) de cada uma destas reações (CASTELLS, M., 2017; CASTELLS, M. C., 2017).

Tabela 1 - Classificação das reações de hipersensibilidade imediata a agentes antineoplásicos de acordo com o Fenótipos e Endótipos. Adaptado de Castells, 2017 (CASTELLS, M. C., 2017)

	Tipos de Reações		
	reação Tipo I ( IgE mediada)	Tempestade de Citocinas	Mistas
células efectoras	Eosinófilos/ Mastócitos	linfócitos T	Eosinófilos/ Mastócitos/ linfócitos T
Biomarcadores	Triptase/histamina	IL-6/TNF-alfa/IL-1 Beta	Triptase/histamina/IL-6/TNF-alfa/IL-1 Beta
Sintomas	rubor em face, prurido, urticária, falta de ar, edema laríngeo, náuseas, vômitos, diarreia, dessaturação, hipotensão e choque	rubor em face, tremores, calafrios, febre, dores nas costas, cefaléia, dessaturação, hipotensão e choque	rubor em face, prurido, urticária, tremores, calafrios, febre, dores nas costas, cefaléia, falta de ar, edema laríngeo, náuseas, vômitos, diarreia, dessaturação, hipotensão e choque

Uma vez definido o fenótipo da reação e o provável mecanismo de ação envolvido, é importante classificarmos a reação inicial a um agente antineoplásico quanto a sua gravidade. Uma das classificações de gravidade mais utilizadas é a de Brown, categorizando as reações em graus I, II ou III, resumidos na tabela 2 (BROWN, 2004), ressaltando que as reações de grau II e III ( moderadas e graves) caracterizam quadros de anafilaxia, pois envolvem dois ou mais sistemas orgânicos. O grau da reação inicial juntamente com a avaliação do fenótipo e dos biomarcadores *in vitro* e *in vivo* serão

fundamentais para definição do protocolo de dessensibilização ou de provocação a ser utilizados, caso haja a indicação.

Tabela 2 - Classificação das reações de hipersensibilidade de acordo com o grau de gravidade da reação, adaptada de Brown, 2004 (BROWN, 2004)

Grau	Quadro Clínico	Sinais e sintomas
<b>Grau I/ Leve</b>	Cutâneo e/ou sub-cutâneo	Urticária, vermelhidão em face, eritema, angioedema <b>Envolve apenas 1 órgão ou sistema</b>
<b>Grau II/ Moderada</b>	Cutâneo, cardiovascular, respiratório	Dispnéia, estridor, sibilos, náusea, vômitos, tontura, sudorese, dor ou aperto no peito, dor abdominal <b>Envolve 2 órgãos ou sistemas</b>
<b>Grau III/ Grave</b>	Hipóxia, hipotensão, comprometimento neurológico	Hipotensão (pressão sistólica menor do que 90 mmHg em adultos), cianose ou queda na saturação de O <sub>2</sub> , confusão mental, síncope, convulsões ou incontinência <b>Envolve 1 ou 2 órgãos com alterações em sinais vitais</b>

### 1.3.2. Diagnóstico das reações de hipersensibilidade a quimioterápicos

O diagnóstico das RH a quimioterápicos baseia-se na história clínica, testes cutâneos, e testes validados *in vitro*. A história clínica completa é fundamental para o diagnóstico destas reações. Todo paciente que apresenta reação de hipersensibilidade a quimioterápicos deve ser encaminhado a um especialista em alergia e imunologia clínica para uma avaliação detalhada.

Os testes cutâneos de leitura imediata podem ser utilizados com quimioterápicos e a especificidade e sensibilidade dos mesmos varia de acordo com o medicamento e com mecanismo de ação envolvido na RH, podendo ser considerados biomarcadores *in vivo* para reações IgE mediadas (CASTELLS, M. C., 2017; DEMOLY; CASTELLS, 2018; GIAVINA-BIANCHI; PATIL; BANERJI, 2017). Idealmente, eles devem ser realizados 4-6 semanas após a reação, o que pode ser um problema no caso de pacientes oncológicos que têm urgência na retomada do tratamento, uma vez que os testes serão decisivos para a definição da terapia a ser utilizada.

A mensuração de biomarcadores como a triptase e a interleucina-6 (IL-6) durante uma RH auxiliam no diagnóstico da anafilaxia, assim como no diagnóstico do mecanismo envolvido na reação. A triptase é um biomarcador reconhecido de anafilaxia, cujo

aumento indica ativação aguda de mastócitos. Minutos após a desgranulação de mastócitos pode ser detectado aumento dos níveis séricos de triptase, sendo considerados elevados os valores acima de 11,4 ng/ml. Pacientes com níveis de triptase basal muito baixos, podem não apresentar níveis séricos de triptase acima do normal durante uma anafilaxia, e nestes casos um aumento de 2 ng/ml + 1,2 vezes o valor da triptase basal pode ser considerado significativo. A especificidade da triptase é alta porém a sensibilidade é baixa (CASTELLS, M., 2017). A IL-6 pode estar elevada nos casos de reações mediadas por citocinas, do tipo *citokine storm* ou mistas (CASTELLS, M. C., 2017).

O teste de ativação de basófilos e a dosagem sérica de IgE específica foram usados experimentalmente como biomarcadores *in vitro* para o diagnóstico de RH imediatas a quimioterápicos do grupo das platinas. A IgE específica apresentou baixa sensibilidade em comparação aos testes cutâneos para platinas (CAIADO; PICARD, 2014). Giavina-Bianchi e colaboradores testaram a sensibilidade e a especificidade do teste de ativação de basófilos (BAT) em pacientes que apresentaram RH imediata a platinas. Foram avaliados 15 pacientes sendo a sensibilidade do BAT de 73% e a especificidade de 100%. Pacientes que apresentaram reações iniciais mais graves, apresentaram também uma maior expressão de CD63, que neste contexto poderia ser usado como preditivo da gravidade da reação. (GIAVINA-BIANCHI; GALVAO; PICARD; CAIADO *et al.*, 2017). Ainda não existe validação destes *testes in vitro* para agentes quimioterápicos de outros grupos, como por exemplo para os taxanos. O desenvolvimento de testes *in vitro* menos invasivos, tanto para o diagnóstico quanto como preditivos de RH a quimioterápicos, poderia acelerar o diagnóstico e diminuir a risco de RH graves a quimioterapia.

### 1.3.3. Tratamento das reações de hipersensibilidade a quimioterápicos

O tratamento das RH a quimioterápicos envolve o tratamento da reação aguda e o tratamento pós-crítico, quando será definido o diagnóstico do agente causal. Nos casos de anafilaxia, na reação aguda, a adrenalina aquosa, concentração 1/1000, deve ser aplicada na dose de 0,3 a 0,5 ml (0,01 mg/kg em crianças até o máximo de 0,3mg) por via intramuscular (IM) na face anterolateral da coxa a cada cinco a dez minutos, como

medicação de primeira escolha (SIMONS; ARDUSSO; DIMOV; EBISAWA *et al.*, 2013).

O protocolo de tratamento após a reação inicial será definido de acordo com o medicamento utilizado e pelos resultados de biomarcadores *in vivo* (testes cutâneos) e *in vitro*. A dessensibilização rápida a medicamentos é um procedimento que modifica temporariamente a resposta imune de um paciente a um determinado agente, gerando tolerância clínica e permitindo que o paciente receba a medicação de primeira-escolha. Os protocolos de dessensibilização são individualizados, e serão indicados com base na estratificação do risco, ou seja, levando-se em conta o tipo (Tabela 2) e o grau de gravidade da reação inicial (Tabela 3).

O protocolo de dessensibilização é realizado com uma a quatro soluções do medicamento a ser administrado (cada uma com 250 a 300 ml de soro glicosado 5% ou solução salina), baseado na estabilidade e nas diretrizes de administração do mesmo. A infusão destas soluções ocorre em etapas consecutivas com taxas crescentes de concentração e infusão, sendo os protocolos mais utilizados os de 3 bolsas com 12 etapas ou 4 bolsas com 16 etapas. Cada etapa tem intervalos de 15 minutos, sendo que as doses administradas em cada etapa são 2 a 2,5 vezes maiores que a dose da etapa anterior. Durante o último passo, a taxa de infusão é de 80 a 120 ml/h, até completar a dose alvo.

#### 1.4. Reações de hipersensibilidade imediata aos Taxanos

Os taxanos são parte integrante do regime de tratamento administrados em pacientes com vários tipos de tumores, incluindo o câncer de mama, ovário, próstata e pulmão, e estão entre os grupos de quimioterápicos que mais causam RHMI. Fazem parte dos quimioterápicos deste grupo o paclitaxel, docetaxel, nab-paclitaxel e cabazitaxel.

##### 1.4.1. Paclitaxel

O paclitaxel é um composto natural, originalmente isolado de uma árvore denominada *Taxus brevifolia* na década de 60. Em 1980, finalmente, uma formulação adequada para sua administração endovenosa foi desenvolvida, mas por ser insolúvel em água, sua formulação foi desenvolvida usando o solvente Cremofor EL. Exerce seu efeito

antineoplásico através da ação em microtúbulos, causando bloqueio mitótico e morte celular. Está indicado no tratamento do câncer de mama, ovário, de pulmão de “não pequenas células”, dentre outros, e sua infusão é feita semanal ou a cada 3 semanas. Por ser necessária produção em larga escala, atualmente o método de escolha para sua produção é por cultura de células vegetais da espécie *Taxus* (PICARD; CASTELLS, 2015).



Figura 1. Árvore *Taxus brevifolia*

O paclitaxel apresentou um alto número de RH nos estudos fase I. Kris e colaboradores conduziram estudo fase I com paclitaxel e a incidência de RH grau 3 foi alta, em 18% dos pacientes. Wiernik e colaboradores, também em estudo fase I, avaliaram 34 pacientes que receberam 83 ciclos de paclitaxel. Três dos quatro primeiros pacientes que receberam a medicação apresentaram RH grau três alguns minutos após o início da segunda infusão, que por sua vez foi administrada 3 semanas após a primeira infusão. Dois destes pacientes foram tratados novamente com a medicação após receberem pré-medicação com difenidramina e dexametasona e um apresentou novamente anafilaxia. Na tentativa de conter as RH foram instituídos aumento do tempo de infusão para 6 horas e uso de pré-medicação com dexametasona, difenidramina e

famotidina. (KRIS; O'CONNELL; GRALLA; WERTHEIM *et al.*, 1986; WIERNIK; SCHWARTZ; STRAUMAN; DUTCHER *et al.*, 1987). A padronização de esquemas de pré-medicação diminuiu a incidência de RH para 10% dos pacientes, sendo 1% de reações graves (BOOKMAN; KLOTH; KOVER; SMOLINSKI *et al.*, 1997; GENNARI; GUARNERI; LANDUCCI; ORLANDINI *et al.*, 2002; MARKMAN; KENNEDY; WEBSTER; PETERSON *et al.*, 1997; WEISS; DONEHOWER; WIERNIK; OHNUMA *et al.*, 1990).

#### 1.4.2. Docetaxel

O docetaxel foi desenvolvido em 1986 na busca por uma alternativa mais solúvel e mais fácil de produzir do que o paclitaxel. Foi obtido através de um processo semissintético utilizando um precursor do paclitaxel, o 10-desacetilbacatina III, também extraído de uma árvore, denominada *Taxus baccata*. Apesar de uma maior solubilidade do que o paclitaxel, a molécula permanece insolúvel em água e a formulação faz uso do solvente polissorbato 80 (Tween 80). É usado no tratamento de câncer de mama, ovário, próstata, cabeça e pescoço, pulmão “não pequenas células”, e adenocarcinoma gástrico. Vários eventos adversos inesperados foram descritos durante os ensaios de fase II com docetaxel. A maioria dos pacientes (> 50%) apresentou RH imediata, mesmo com o uso de pré-medicação com anti-histamínicos e corticoides 30 minutos antes da administração do quimioterápico (PICCART; GORE; TEN BOKKEL HUININK; VAN OOSTEROM *et al.*, 1995). Um novo regime de pré-medicação com dexametasona oral 8 mg duas vezes ao dia, iniciando 3 dias antes da infusão reduziu significativamente a prevalência destas reações para 5% dos pacientes (GENNARI; GUARNERI; LANDUCCI; ORLANDINI *et al.*, 2002; SYRIGOU; DANNOS; KOTTEAS; MAKRILIA *et al.*, 2011).

#### 1.4.3. Nab-Paclitaxel

O Nab-paclitaxel é uma nova formulação de paclitaxel, que não contém em sua formulação o solvente Cremofor EL. Nesta, o paclitaxel é ligado a nano partículas de albumina, que encapsulam as moléculas hidrofóbicas de paclitaxel, melhorando a sua solubilidade e aumentando a sua captação pelo tumor. É aprovado para o tratamento de

câncer de mama, pulmão de “células não pequenas” e adenocarcinoma do pâncreas. Como o solvente Cremofor EL foi associado como uma das possíveis causas das RH ao taxol, a nova formulação sem o solvente foi administrada sem pré-medicação e em infusões de 30 minutos nos estudos principais. Um estudo fase III que realizou comparação direta entre nab-paclitaxel e paclitaxel (este último administrado com pré-medicação) revelou que a taxa de RH foi maior no grupo paclitaxel, dado que sugere o envolvimento do solvente na fisiopatologia destas RH (GRADISHAR, 2006; YAMAMOTO; MAEDA; NAGASHIMA; KUBO *et al.*, 2017). Porém, nos estudos de farmacovigilância pós-comercialização realizados pelo fabricante, também foram registrados casos de RH graves e até fatais com nab-paclitaxel, sugerindo uma possível sensibilização ao princípio ativo (taxano).

#### 1.4.4. Cabazitaxel

O cabazitaxel é um taxano semissintético que foi desenvolvido a partir de um precursor para casos de resistência ao paclitaxel e docetaxel [22]. Da mesma forma que o docetaxel, é formulado em Polissorbato 80, e a incidência de RH é semelhante ao do docetaxel, em torno de 6% (PIVOT; KORALEWSKI; HIDALGO; CHAN *et al.*, 2008).

#### 1.5. Mecanismos fisiopatológicos e diagnóstico das reações de hipersensibilidade imediata aos taxanos

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas RH imediatas aos taxanes ainda não estão totalmente esclarecidos. Existem hipóteses de que três mecanismos diferentes possam estar envolvidos: ativação de complemento com liberação de anafilatoxinas pelos solventes usados nas formulações, ativação direta de mastócitos e basófilos, e, mais recentemente, evidências de reações IgE mediadas ( Figura 2) (PICARD; CASTELLS, 2015).



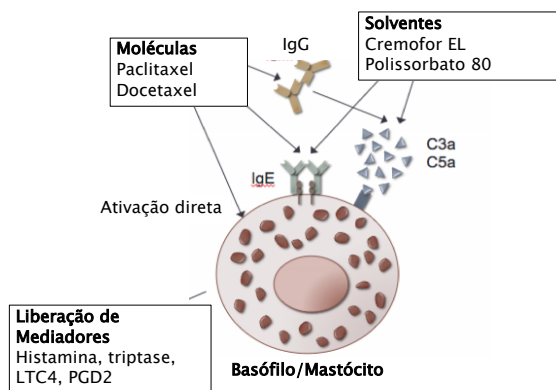


Figura 2. Mecanismos de reação de hipersensibilidade a taxanos, adaptado de Picard, 2015 (PICARD; CASTELLS, 2015)

Foram realizados estudos *in vitro* com os solventes Cremofor EL e polissorbato 80 para avaliar a ativação de complemento por eles. O Cremophor EL sozinho desencadeou a ativação do complemento na mesma proporção que o paclitaxel combinado com Cremophor EL, em concentrações equivalentes, sugerindo que o Cremophor EL tenha sido o responsável por esse efeito (SZEBENI; MUGGIA; ALVING, 1998). Da mesma forma, foram comparados polissorbato 80 associado ao docetaxel *versus* polissorbato 80 isolado, e ambos causaram ativação do complemento *in vitro* na mesma proporção (WEISZHÁR; CZÚCZ; RÉVÉSZ; ROSIVALL *et al.*, 2012). Baseado nestes achados, concluiu-se que os solventes poderiam ser os responsáveis por desencadear as RH, porém esta hipótese ainda não foi demonstrada *in vivo*.

Essayan e colaboradores relataram o caso de uma paciente com câncer de ovário que sofreu repetidas RH imediatas ao paclitaxel, a partir da primeira infusão (ESSAYAN; KAGEY-SOBOTKA; COLARUSSO; LICHTENSTEIN *et al.*, 1996). Foi realizado nesta paciente e em três controles, teste de ativação de basófilos, com basófilos purificados. O paclitaxel isolado, sem a presença do solvente Cremophor EL, induziu liberação de histamina dos basófilos na paciente e nos três controles saudáveis e o Cremophor EL isolado não induziu liberação de histamina. Os autores levantaram a hipótese de que o paclitaxel seria o causador da RH. Este estudo não conseguiu identificar mecanismos que diferenciem pacientes reativos de controles, uma vez que também houve ativação dos basófilos e liberação de histamina nos 3 controles sadios testados (ESSAYAN; KAGEY-SOBOTKA; COLARUSSO; LICHTENSTEIN *et al.*, 1996). Pelo fato da RH ter ocorrido na primeira reação, sem sensibilização prévia, somando-se ao fato

de que a ativação dos basófilos ocorreu tanto na paciente quanto em controles, os autores levantaram a hipótese de que esta ativação ocorreria por ativação direta dos basófilos através de um mecanismo não-IgE mediado (ESSAYAN; KAGEY-SOBOTKA; COLARUSSO; LICHTENSTEIN *et al.*, 1996; ESSAYAN; KAGEY-SOBOTKA; LICHTENSTEIN, 1996).

A possibilidade de um mecanismo imunológico mediado por IgE foi levantada recentemente, após a descrição de um caso de RH imediata grau 3 por paclitaxel que apresentou testes cutâneos e IgE sérica específica positivos para o princípio ativo e negativos para o solvente (PRIETO GARCÍA ; PINEDA DE LA LOSA, 2010). A partir deste achado, outros grupos passaram a avaliar a positividade de testes cutâneos em pacientes com RHI a taxanos. Picard e colaboradores realizaram testes cutâneos em 145 pacientes que apresentaram RH a taxanos, sendo que 103 (71%) apresentaram resultados positivos. (PICARD; PUR; CAIADO; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2016). Mais recentemente Pagani e colaboradores avaliaram o papel dos testes cutâneos de leitura imediata para taxanos em um estudo multicêntrico com 84 pacientes, onde apenas 14 (16,7%) apresentaram testes intradérmicos positivos. Pacientes com testes positivos apresentaram maior frequência de sintomas cutâneos, e a sensibilidade do teste cutâneo foi baixa (8,7% a 24,6%) com alta especificidade (100%). (PAGANI; BAVBEK; DURSUN; BONADONNA *et al.*, 2019). Em conclusão, apesar da baixa sensibilidade, os testes cutâneos para taxanos foram úteis especialmente nos casos de reações graves com envolvimento cutâneo (PAGANI; BAVBEK; DURSUN; BONADONNA *et al.*, 2019; VANHAELEN; DUCHATEAU; VANHAELEN-FASTRÉ; JAZIRI, 2002).

Com base nos estudos acima descritos, conclui-se que as RH mediadas por IgE são mais prováveis entre pacientes que apresentaram reações anafiláticas e sintomas cutâneos (PAGANI; BAVBEK; DURSUN; BONADONNA *et al.*, 2019; PICARD; PUR; CAIADO; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2016). Nos casos em que existe suspeita de reação IgE mediada e a reação ocorreu na primeira infusão, especula-se se a sensibilização possa ter ocorrido anteriormente, uma vez que o paclitaxel e os precursores do docetaxel foram isolados de diferentes espécies de árvores da espécie Teixos (VANHAELEN; DUCHATEAU; VANHAELEN-FASTRÉ; JAZIRI, 2002).

Os testes cutâneos devem ser realizados idealmente após duas semanas da reação o que pode retardar o tratamento. O desenvolvimento de testes *in vitro*, menos invasivos,

e possivelmente mais sensíveis, poderia auxiliar no diagnóstico e na prevenção de reações graves a quimioterapia.

Uma vez que existem evidências de um possível mecanismo IgE mediado, o teste de ativação de basófilos pode ser uma abordagem importante. Não existem relatos na literatura de testes de ativação de basófilos para taxanos, avaliando o aumento da expressão de CD63 e CD203c.

#### 1.6. Teste de ativação de basófilos (BAT)

Os basófilos são um dos tipos celulares menos abundantes no sangue, correspondendo a menos de 1% dos leucócitos circulantes, e estão envolvidos nos mecanismos imunológicos de processos alérgicos e parasitoses. O basófilo, assim como o mastócito, possui receptores de alta afinidade para os anticorpos IgE circulantes (FcεRI) em sua membrana celular e seu papel nas anafilaxias tem sido cada vez mais estudado (KOROSEC; TURNER; SILAR; KOPAC *et al.*, 2017).

Quando um determinado alérgeno promove ligação cruzada entre duas IgEs que estão unidas aos basófilos, é desencadeada uma cascata de reações que culmina na liberação de mediadores inflamatórios pré-formados, existentes nos grânulos citoplasmáticos, e neoformados. Esta desgranulação não ocorre somente em reações mediadas por IgE, podendo também ser desencadeada por outros estímulos diretos para os quais o basófilo possua receptores (KLEINE-TEBBE; ERDMANN; KNOL; MACGLASHAN *et al.*, 2006).

A ativação dos basófilos pode ser detectada por meio do marcador CD63, uma glicoproteína pouco abundante na membrana celular da célula em repouso, mas presente em grande quantidade nas membranas de seus grânulos citoplasmáticos armazenadores de mediadores pró-inflamatórios (KNOL; MUL; JANSEN; CALAFAT *et al.*, 1991). Quando ocorre a ativação dos basófilos, há fusão das membranas dos grânulos com a membrana celular, liberação dos mediadores pré-formados e aumento do número de moléculas CD63 na superfície celular (KNOL; MUL; JANSEN; CALAFAT *et al.*, 1991; MONNERET; GUTOWSKI; BIENVENU, 1999). A molécula CD63 não é específica de basófilos, sendo também encontrada em plaquetas, eosinófilos e monócitos (KLEINE-TEBBE; ERDMANN; KNOL; MACGLASHAN *et al.*, 2006). Outra molécula usada para

caracterizar a ativação basofílica é o CD203c (BÜHRING; SEIFFERT; GIESERT; MARXER *et al.*, 2001), que é expressa exclusivamente na membrana de basófilos e mastócitos (BÜHRING; SIMMONS; PUDNEY; MÜLLER *et al.*, 1999). Ao contrário do CD63, o CD203c apresenta uma expressão basal em basófilos em repouso, que aumenta significativamente durante sua ativação. O teste de ativação de basófilos (BAT) baseado em citometria de fluxo é utilizado neste contexto, pois por meio dele é possível aferir a expressão tanto de CD63 quanto de CD203c na população de basófilos avaliada (Figura 3).

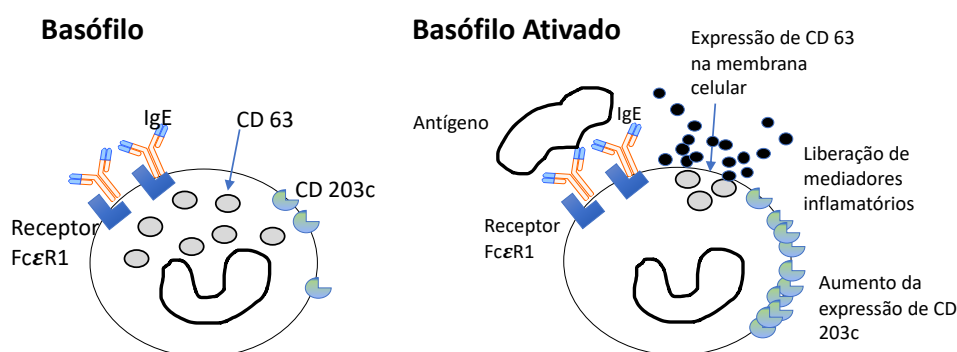


Figura 3. Aumento da expressão de CD63 e CD203c no basófilo ativado (CAMPOS; GALVÃO; KALIL; CASTELLS *et al.*, 2019)

Tendo em vista o papel dos basófilos nas reações de hipersensibilidade, diversas pesquisas têm estudado e utilizado o BAT como ferramenta diagnóstica em diferentes RHMI. Um total de 47 estudos foram revisados para avaliar a eficiência do BAT no diagnóstico dessas reações. Nos estudos, diferentes metodologias para realização do BAT foram utilizadas, e verificamos que as concentrações dos medicamentos e os valores de corte para a positividade do teste não foram padronizados (CAMPOS; GALVÃO; KALIL; CASTELLS *et al.*, 2019).

Os resultados do BAT, em relação a especificidade e sensibilidade, variaram de acordo com a classe do medicamento estudado, e estão resumidos na Tabela 3. O BAT tem resultados promissores em RH imediatas à pirazolona (reatores seletivos), bloqueadores neuromusculares, beta-lactâmicos e compostos de platina, todos exemplos de RHMI mediada por IgE. A sensibilidade foi menor entre os anti-inflamatórios não esteroidais (reatores não seletivos) e as quinolonas, ambos grupos de drogas que

desgranulam mastócitos e provavelmente basófilos por mecanismos não mediados por IgE. O tempo entre o teste e a reação também pode afetar os resultados, e intervalos mais baixos podem aumentar a sensibilidade do BAT (CAMPOS; GALVÃO; KALIL; CASTELLS *et al.*, 2019).

Tabela 3 - Sensibilidade e Especificidade do Teste de Ativação de Basófilos por classe de medicamentos, adaptado de Campos, 2019 (CAMPOS; GALVÃO; KALIL; CASTELLS *et al.*, 2019)

Medicamento	# publicações	Marcador de ativação	Sensibilidade	Especificidade	N
Pirazolonas	5	CD 63	42,3- 70%	85,7 - 100	209
Múltiplos anti-inflamatórios não hormonais	12	CD63/CD203c/CD69	15-100	31-100	696
Bloqueadores neuro-musculares	9	CD3/CD45/ CD203c	36-92	93-100	486
Beta-lactâmicos	11	CD 203c /CD63	22-55	79-100	875
Quinolonas	9	CD 203c or CD63	15-100	88-100	251
Platinas	1	CD 203c or CD63	73	100	15

Há poucas publicações a respeito da aplicação do BAT para RH a quimioterápicos, salientando-se estudo realizado com quimioterápicos do grupo das platinas (GIAVINA-BIANCHI; GALVAO; PICARD; CAIADO *et al.*, 2017), com sensibilidade de 73% e especificidade de 100%. Ainda não existem estudos com BAT para os taxanos.

## 2. Pergunta científica

O teste de ativação de basófilos pode ser usado como um biomarcador *in vitro* que auxilie no diagnóstico de reações anafiláticas a taxanos, uma vez que existem evidências de mecanismo mediado por IgE envolvido nessas reações, especialmente nas reações graves?

### 3. Objetivo

Avaliar o teste de ativação dos basófilos, através da expressão das proteínas CD63 e CD203c, como biomarcador para o diagnóstico de anafilaxia a taxanos.

- Determinar a sensibilidade e especificidade do teste de ativação de basófilos no diagnóstico de anafilaxia a taxanos.
- Avaliar a ação dos taxanos na ativação de basófilos em controles sadios (população geral)
- Avaliação dos possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas reações anafiláticas a taxanos

## 4. Métodos

### 4.1. Casuística e delineamento

Estudo prospectivo transversal realizado nos hospitais Brigham and Women's Hospital (BWH) e Dana-Farber Cancer Institute (DFCI), filiados à Harvard Medical School, em Boston, Massachusetts, EUA. O projeto foi submetido e aprovado pelos comitês de ética em pesquisa Partners Institutional Review Board (protocolos 13-288 e 2012P002275) e CAPPesq do Hospital das Clínicas (Plataforma Brasil: CAAE: 22701913.6.0000.0068). Os pacientes que concordaram em participar, assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e foram incluídos no estudo.

Foram selecionados pacientes portadores de neoplasias com história clínica de anafilaxia a um quimioterápico do grupo dos taxanos. Todos os pacientes incluídos deveriam apresentar história prévia de RH imediata a taxano classificadas como grau 2 ou grau 3 (anafiláticas), e teste cutâneo de leitura imediata positivo para a medicação implicada na reação, sempre que possível a realização do mesmo.

Os voluntários foram encaminhados pelo oncologista responsável ao Ambulatório de Dessensibilização do BWH. Em uma primeira consulta de triagem, os pacientes foram avaliados por residentes ou médicos colaboradores do programa de Alergia e Imunologia do BWH, que confirmaram o diagnóstico de anafilaxia e de sensibilização aos taxanos. O grau da gravidade da reação assim como o fenótipo da mesma, foram classificados de acordo com as Tabelas 1 e 2. Os testes cutâneos de punctura (*prick test*) foram realizados na superfície volar do antebraço, utilizando-se uma gota do quimioterápico nas concentrações 0,4 mg/ml para docetaxel ou 1 mg/ml para paclitaxel. Os testes intradérmicos foram realizados com volume injetado de 0,03 ml na superfície anterior do antebraço, nas concentrações de 0,4 mg/ml de docetaxel e 0,001 mg/ml e 0,01 mg/ml (caso negativo com 0,001 mg/ml) de paclitaxel. A leitura dos testes foi realizada após 20 minutos e foram considerados testes positivos aqueles que desencadearam pápula com diâmetro superior a no mínimo 3 mm maior que aquele produzido pelo controle negativo (diluente) para o teste de punctura, ou quando foi constatado que a pápula dobrou de tamanho em relação a pápula inicial no caso do teste intradérmico. O controle positivo do teste de punctura foi Histamina (10 mg/mL) e o controle negativo solução salina.



#### 4.1.1. Critérios de inclusão:

- Anafilaxia a um quimioterápico do grupo dos taxanos
- Pacientes adultos (maiores de 18 anos), com diagnóstico de câncer e indicação de tratamento com quimioterápico da classe dos taxanes

#### 4.1.2. Critérios de exclusão:

- Utilização crônica de corticosteroides
- Testes cutâneos negativos para o taxano causador da reação inicial

As amostras de sangue dos pacientes foram obtidas antes da realização da dessensibilização e da administração de medicações profiláticas (anti-histamínicos e corticosteroides), ou no dia da realização dos testes cutâneos de leitura imediata. O BAT foi realizado em até 6 horas após a coleta de sangue.

Foram formados dois grupos:

- Pacientes: pacientes oncológicos, com diagnóstico de anafilaxia a taxanos e em tratamento no DFCI. O BAT foi realizado em uma ocasião nesse grupo de pacientes.
- Controles: voluntários sadios que nunca haviam se exposto aos quimioterápicos do grupo dos taxanos e que se dispuseram a doar uma amostra de sangue para realização do BAT.

#### 4.1.3 Classificação das reações de hipersensibilidade imediatas

As RH iniciais ao taxano foram classificadas de acordo com o sistema de Brown, descrito na Tabela 2 (BROWN, 2004).

#### 4.2. Teste de Ativação de Basófilos

O teste de ativação de basófilos foi realizado logo antes do procedimento de dessensibilização com o quimioterápico causador da reação ou no dia da realização dos testes cutâneos, e teve o objetivo de analisar o grau de ativação dos basófilos através da expressão de CD63 e de CD203c na superfície celular. O sangue foi coletado em tubos a vácuo contendo heparina e o ensaio foi executado em até 6 horas após a coleta. Tubos contendo 200 µl de sangue total foram incubados com e sem estímulo (100 µl paclitaxel ou docetaxel) por 45 minutos, em banho-maria, na temperatura de 37° C. Foram testadas pelo menos três diluições de cada um dos quimioterápicos envolvidos (Tabela 4), baseadas na concentração utilizada para realização dos testes cutâneos (paclitaxel - 1mg/ml no teste de puntura e 0,01 e 0,001 mg/ml no teste intradérmico; docetaxel - 0,4 mg/ml no teste de puntura e 0,04 mg/ml no teste intradérmico) (PICARD; PUR; CAIADO; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2016) e na concentração plasmática final da medicação quando administrada no paciente segundo a bula dos produtos (paclitaxel - 0,3 a 1,2 mg/ml e docetaxel - dose máxima de 0,74 mg/ml). Ao término da estimulação com e sem o quimioterápico, as amostras foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz, durante 30 minutos, com a adição de 2,5µl dos seguintes anticorpos: anti-CD123 conjugado com *allophycocyanin* (APC-*Biolegend*), anti-HLADR conjugado com isotiocionato de fluoresceína (FITC-*Biolegend*), anti-CD63 conjugado com ficoeritrina (PE-*Biolegend*) e anti-CD203c conjugado com “*Brilliant Violet*” (BV-*Biolegend*).

Após os 30 minutos de marcação com os anticorpos, os eritrócitos foram retirados por meio da adição de 4 ml de solução de lise (*Lysis Solution - Biolegend*), com tempo de espera de 15 minutos e centrifugação durante 5 minutos (*Beckman GPR Centrifuge*). Posteriormente, as células foram lavadas por duas vezes com 4 ml de solução tampão para citometria de fluxo (*FACS Buffer solution*), suspendidas novamente com 300 µl da mesma solução e analisadas no citômetro de fluxo (Canto II, Becton-Dickinson BD, San Jose, California, EUA). A população de basófilos foi delimitada pela expressão de CD123 (APC) e ausência de expressão de HLA DR (FITC). As expressões de CD63 e CD203c foram analisadas dentro desta população. Os resultados da ativação de basófilos foram expressos através da mediana da intensidade da fluorescência (MFI) apresentada pelas células. Os resultados da citometria foram analisados através do programa FlowJo versão 9.0 (TreeStar, Ashland, Ore).

Como controle positivo do ensaio, foi utilizado um tubo com 200 µl de sangue total, 100 µl de solução salina e 3µl de anticorpo anti-IgE (Biolegend). Como controle negativo foi utilizado tubo com adição de 200 µl de sangue total e 100 µl de solução salina.

Tabela 4 - Concentrações seriadas de paclitaxel e docetaxel utilizadas no teste de ativação de basófilos

Diluição	Paclitaxel	Docetaxel
1:1	1 mg/ml	0,4 mg/ml
1:2	0,5 mg/ml	0,2 mg/ml
1:10	0,1 mg/ml	0,04 mg/ml
1:100	0,01 mg/ml	0,004 mg/ml
1:1000	0,001 mg/ml	0,0004 mg/ml

#### 4.3 Análise Estatística

As variáveis contínuas foram expressas como valores absolutos, porcentagens relativas ou média  $\pm$  desvio padrão (DP). Variáveis categóricas foram apresentadas como números e percentuais, analisados pelo teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher. O valor de corte para a positividade do BAT (*threshold*) foi calculado através da construção de curva "Receiver Operating Characteristic" (ROC). O valor de corte ideal para o teste é escolhido quando a sensibilidade e a especificidade estão o mais elevadas possível. A análise foi realizada com o software GraphPad Prism (versão 8) e valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização das amostras

Foram selecionados 15 pacientes que apresentaram reação anafilática a taxanos para a realização do BAT, sendo 14 do sexo feminino e 1 do sexo masculino. A caracterização geral dos pacientes e das reações iniciais, além dos resultados de testes cutâneos e valores de triptase durante a reação inicial (quando presentes em prontuário) encontram-se na Tabela 5, assim como as características dos indivíduos que compuseram o grupo controle estão descritas na Tabela 6.

A média de idade do grupo de pacientes alérgicos foi de 54 anos, variando de 31 a 77 anos, enquanto a média etária do grupo controle foi de 39 anos, variando de 26 a 56 anos. No grupo de pacientes 94% dos pacientes eram do sexo feminino, enquanto no grupo controle 75% dos voluntários eram mulheres. As características dos participantes dos grupos de pacientes e controles eram similares, incluindo a frequência de atopia de 60% nos dois grupos, excetuando-se a idade atual, uma vez que a média etária dos participantes do grupo controles era menor.

Com relação aos tipos de neoplasias, o mais prevalente foi o câncer de ovário (46%), seguido do câncer de mama (26%) e câncer de útero (13%). O paclitaxel foi a droga de escolha em 13 doentes (87%) e 2 pacientes receberam docetaxel (13%). Todas as reações ocorreram na primeira ou segunda infusões, sendo que 10 (66%) das reações ocorreram na primeira infusão, 1 na segunda infusão (6%) e nos casos remanescentes (26%), os pacientes apresentaram reação leve na primeira infusão, toleraram a reintrodução da medicação, porém evoluíram com reação graves nas próximas exposições.

Em relação a gravidade da reação, as reações iniciais foram classificadas como grau 2 em 2 pacientes (13%) e grau 3 em 13 pacientes (87%). O valor de triptase por ocasião da RH inicial pôde ser recuperado do prontuário de 5 paciente, estando em todos os casos abaixo do valor normal de 11,4 mg/ml. Três dos 15 pacientes não realizaram testes cutâneos, pois apresentaram contra-indicações: gestante, caquexia, uso crônico de anti-histamínicos ou uso de anti-histamínicos horas antes da realização do teste. Um paciente apresentou sintomas de tosse e dispneia durante a fase inicial do teste, que foi

suspenso e considerado inconclusivo. Nenhum paciente apresentou teste cutâneo positivo para taxanos no teste de puntura, sendo que a maioria apresentou positividade na maior concentração do teste intradérmico (0,01 mg/ml)

Tabela 5 - Caracterização geral dos pacientes e das reações de hipersensibilidade a taxanos

Paciente	Tipo de tumor	Sexo	Idade	Droga	Exposição	Grau	Sintomas	Alergias	Teste cutâneo	Triptase
Paciente 2	mama	F	40	paclitaxel	primeira/segunda	3	urticária, cardiovascular, edema de glote	Nenhuma	não aplicável, gestante	Não realizada
Paciente 3	gástrico	F	70	docetaxel	primeira/segunda	2	flushing, respiratório	Asma	Positivo ID primeira diluição	Não realizada
Paciente 4	útero	F	48	paclitaxel	primeira	3	flushing, respiratório com dessaturação, gastrointestinal, cardiovascular com hipotensão	Nenhuma	Positivo ID primeira diluição	Não realizada
Paciente 5	ovário	F	53	paclitaxel	primeira	2	flushing, respiratório, cardiovascular, dor lombar, urgência urinária	Nenhuma	Positivo ID primeira diluição	2,9
Paciente 6	ovário	F	59	paclitaxel	primeira	3	flushing, cardiovascular, respiratório com dessaturação	Nenhuma	Positivo ID segunda diluição	2,7
Paciente 7	ovário	F	44	paclitaxel	primeira	3	urticária, respiratório, gastrointestinal	Asma, sulfa, clindamicina	Tosse e dispnéia durante o teste, teste interrompido	Não realizada
Paciente 9	útero	F	72	paclitaxel	primeira	3	flushing, dor lombar, cardiovascular com hipotensão, síncope	nozes (anafilaxia)	Positivo ID primeira diluição / nozes negativo	6,5
Paciente 10	ovário	F	52	paclitaxel	primeira	3	urticária, respiratório, and cardiovascular com hipotensão grave. Reação tardia: Rash cutâneo	contraste iodado	contra-indicado, caquexia	Não realizada
Paciente 11	bexiga	M	55	paclitaxel	primeira	3	urticária, respiratório com dessaturação e tonturas (sistema nervoso central)	asma e urticária	contra-indicado: uso crônico de anti-histamínico	Não realizada
Paciente 12	mama	F	77	paclitaxel	primeira	3	Flushing + respiratório com dessaturação	Nenhuma	Positivo ID primeira diluição	Não realizada
Paciente 13	ovário	F	61	paclitaxel	primeira	3	Flushing, dor abdominal, cardiovascular, respiratório com dessaturação	Rinite alérgica (epitélio de gato)	Positivo ID primeira diluição	Não realizada
Paciente 14	ovário	F	66	paclitaxel	primeira	3	dor lombar, respiratório and cardiovascular (taquicardia)	(epitélio de cão e gato), sulfa	Positivo ID primeira diluição	Não realizada
Paciente 15	mama	F	31	paclitaxel	primeira	3	urticária, respiratório	urticária, sulfa e penicilina	dermografismo no prick; Positivo ID primeira diluição	Não realizada
Paciente 16	ovário	F	58	paclitaxel	primeira	3	dor lombar, respiratório com dessaturação, cardiovascular com hipotensão	penicilina e cefalexina (reação tardia)	Positivo ID primeira diluição	6,2
Paciente 17	mama	F	34	docetaxel	primeira/segunda	3	primeira infusão; edema de língua, convulsão, respiratório na segunda infusão	Nenhuma	Positivo ID primeira diluição	Não realizada

Paciente #1 e # 8 excluídos – reação inicial classificada como grau 1.

Tabela 6 - Caracterização geral dos indivíduos do grupo controle

Controle	Tipo de tumor	Sexo	Idade	Droga	Exposição	Grau	Sintomas	Alergias	Teste cutâneo	Triptase
Controle 18	N/A	F	32	N/A	N/A	N/A	N/A	Nenhuma	N/A	N/A
Controle 19	N/A	F	48	N/A	N/A	N/A	N/A	Asma + Rinite Alérgica	N/A	N/A
Controle 20	N/A	F	51	N/A	N/A	N/A	N/A	Nenhuma	N/A	N/A
Controle 22	N/A	M	35	N/A	N/A	N/A	N/A	Nenhuma	N/A	N/A
Controle 23	N/A	M	42	N/A	N/A	N/A	N/A	Rinite Alérgica	N/A	N/A
Controle 24	N/A	F	26	N/A	N/A	N/A	N/A	Asma + Rinite Alérgica	N/A	N/A
Controle 25	N/A	F	27	N/A	N/A	N/A	N/A	Nenhuma	N/A	N/A
Controle 26	N/A	F	56	N/A	N/A	N/A	N/A	Nenhuma	N/A	N/A

Legenda: N/A = não aplicável

## 5.2. Teste de Ativação de Basófilos (BAT)

No total foram realizados 15 BATs no grupo de pacientes e 8 no grupo controle. A concentração que apresentou maior positividade foi a de 0,1 mg/ml para paclitaxel (1:10 da diluição inicial 1:1 de 1 mg/ml) e de 0,04 mg/ml para docetaxel (1:10 da diluição inicial 1:1 de 0,4 mg/ml). Foram avaliadas as medianas de intensidade de fluorescência (MFI) das expressões dos marcadores CD63 e CD203c após incubação com solução salina (controle negativo) e taxol 0,01mg/ml ou taxotere 0,04 mg/ml nos pacientes e nos indivíduos do grupo controle. As figuras 6 e 7 apresentam exemplos de BAT positivo e negativo expresso por MFI.

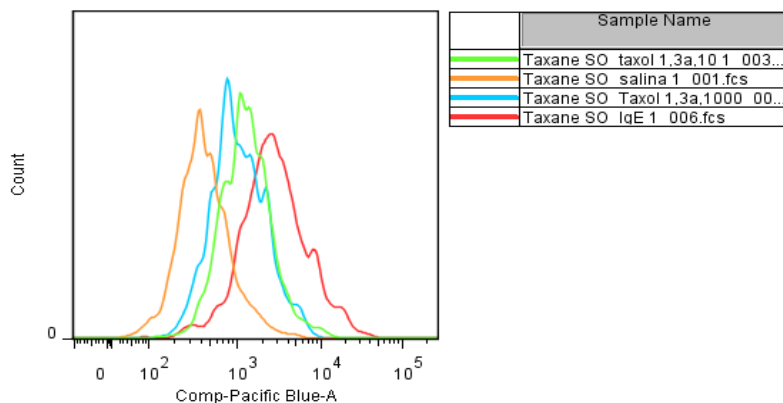


Figura 6. Exemplo de resultado positivo do BAT expresso por MFI (mediana de intensidade de fluorescência). Avaliação da expressão de CD203c após incubação com solução salina (controle negativo) e taxol 0,01mg/ml em paciente que apresentou RH a paclitaxel.



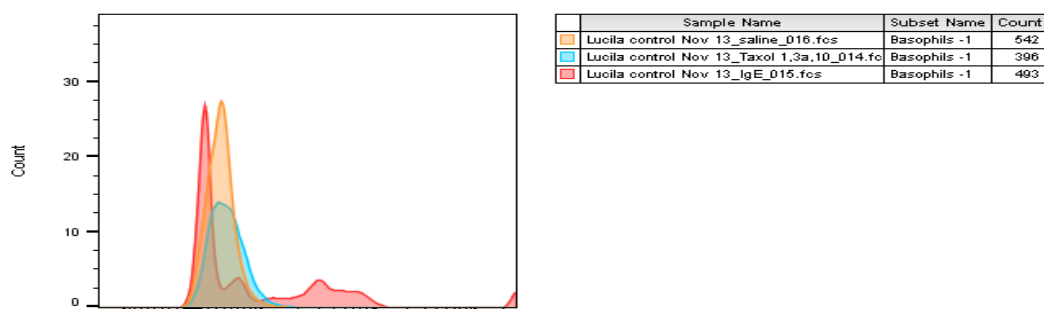


Figura 7. Exemplo de resultado negativo do BAT expresso por MFI (mediana de intensidade de fluorescência). Avaliação da expressão de CD203c após incubação com solução salina (controle negativo) e taxol 0,01mg/ml em indivíduo do grupo controle

A partir do valor da MFI, foi calculado índice de estimulação, dividindo-se a MFI após estimulação com taxol pela MFI da estimulação com salina, para cada um dos marcadores. A Tabela 7 representa o índice de estimulação dos basófilos pelo delta da expressão de CD63 e CD203c na superfície celular, para pacientes e controles após a estimulação com paclitaxel ou docetaxel na diluição 1:10 *versus* (vs) salina.

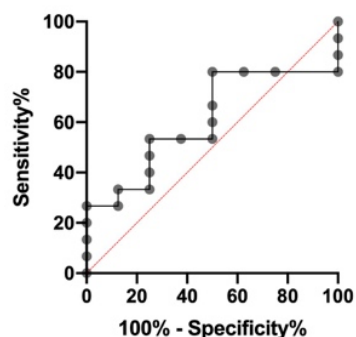
Tabela 7 - Índice de estimulação pela expressão de CD63 e CD203c para pacientes e controles após a estimulação com Taxol 1:10 *versus* salina.

Sujeito	CD203c	CD63
Paciente 2	2,82	1,85
Paciente 3	4,14	1,97
Paciente 4	0,57	0,98
Paciente 5	0,72	0,73
Paciente 6	2,94	1,26
Paciente 7	1,28	1,61
Paciente 9	1,15	1,49
Paciente 10	0,97	0,67
Paciente 11	1,31	1,9
Paciente 12	1,22	1,18
Paciente 13	3,12	1,18
Paciente 14	2,45	1,71
Paciente 15	1,77	4,35
Paciente 16	2,53	2,96
Paciente 17	1,05	1,27
Controle 18	0,92	1,14
Controle 19	1,17	1,03
Controle 20	3,2	1,4
Controle 22	1,11	1,87
Controle 23	0,95	1,31
Controle 24	1,16	1,03
Controle 25	0,88	1,06
Controle 26	1,27	1,73

Pacientes: #02 a 17; Controles: #18 a 26

Para definir quantos pacientes apresentaram o BAT positivo, foi necessário definir um valor de corte para o índice de estimulação do teste (*threshold*) para os dois marcadores avaliados, expressão de CD63 e de CD203c. Os valores foram calculados através da construção de uma curva ROC, com os valores dos índices de estimulação de taxol *versus* salina. O valor de corte ideal para o teste é escolhido quando a combinação da sensibilidade e da especificidade atinge o ponto máximo da curva. Para o CD 63 o ponto de corte foi 1,8 (Figura 4) e para o CD203c foi 1,3 (Figura 5).

ROC curve: ROC of ROC curve CD3 taxol 1:10 garde 2-3



Folds (CD63)	Sensibilidade %	95% CI	Especificidade %	95% CI	Ratio
> 0.70	93	70% to 100%	0	0,0% to 32%	0,93
> 0.86	87	62% to 98%	0	0,0% to 32%	0,87
> 1.0	80	55% to 93%	0	0,0% to 32%	0,8
> 1.0	80	55% to 93%	25	4,4% to 59%	1,1
> 1.1	80	55% to 93%	38	14% to 69%	1,3
> 1.2	80	55% to 93%	50	22% to 78%	1,6
> 1.2	67	42% to 85%	50	22% to 78%	1,3
> 1.3	60	36% to 80%	50	22% to 78%	1,2
> 1.3	53	30% to 75%	50	22% to 78%	1,1
> 1.4	53	30% to 75%	63	31% to 86%	1,4
> 1.4	53	30% to 75%	75	41% to 96%	2,1
> 1.6	47	25% to 70%	75	41% to 96%	1,9
> 1.7	40	20% to 64%	75	41% to 96%	1,6
> 1.7	33	15% to 58%	75	41% to 96%	1,3
> 1.8	33	15% to 58%	88	53% to 99%	2,7
> 1.9	27	11% to 52%	88	53% to 99%	2,1
> 1.9	27	11% to 52%	100	68% to 100%	
> 1.9	20	7,0% to 45%	100	68% to 100%	
> 2.5	13	2,4% to 38%	100	68% to 100%	
> 3.7	6,7	0,34% to 30%	100	68% to 100%	

CD63: Valor limiar (*Threshold*) > 1,8; com sensibilidade de 33% e especificidade de 88%

Figura 4. Curva ROC – Índice de estimulação pela expressão de CD63 após estímulo com paclitaxel 1:10 vs. Salina

De acordo com o *threshold* calculado, o BAT apresentou positividade em 8 dos 15 pacientes testados (53%). A sensibilidade para CD203c foi de 53% e a especificidade de 87% (área sob a curva de 0,66;  $p = 0,19\%$ ) e para CD63 foi, respectivamente, de 33% e 87% (área sob a curva de 0,6;  $p = 0,4$ ). Todos os pacientes que apresentaram aumento de expressão de CD63, expressaram aumento da expressão de CD203c. A Figura 3 mostra um exemplo de BAT com resultado positivo.

Os resultados do BAT, assim como os resultados dos testes cutâneos, grau de gravidade da reação inicial e antecedentes de alergia dos pacientes e controles estão apresentados na Tabela 8. Houve aumento de expressão de CD203c em 8/15 (53%) pacientes e de CD 63 em 5/15 (40%) pacientes, respectivamente. Todos os pacientes com BAT que apresentaram aumento de expressão de CD63, tiveram aumento da expressão de CD203c. Na prática, o aumento da expressão de apenas um dos marcadores é suficiente para considerarmos o resultado do teste positivo.

Tabela 8 - Positividade do BAT (CD203c e CD63) comparada ao teste cutâneo, grau da reação e antecedentes de alergia

Sujeito	CD203c	CD63	BAT	Teste Cutâneo	Grau reação	Antecedente Alergia
Paciente 2	2,82	1,85	Positivo	Não realizado	3	Não
Paciente 3	4,14	1,97	Positivo	Positivo	2	Sim
Paciente 4	0,57	0,98	Negativo	Positivo	3	Não
Paciente 5	0,72	0,73	Negativo	Positivo	2	Não
Paciente 6	2,94	1,26	Positivo	Positivo	3	Não
Paciente 7	1,28	1,61	Negativo	Não realizado	3	Sim
Paciente 9	1,15	1,49	Negativo	Positivo	3	Sim
Paciente 10	0,97	0,67	Negativo	Não realizado	3	Sim
Paciente 11	1,31	1,9	Positivo	Não realizado	3	Sim
Paciente 12	1,22	1,18	Negativo	Positivo	3	Não
Paciente 13	3,12	1,18	Positivo	Positivo	3	Sim
Paciente 14	2,45	1,71	Positivo	Positivo	3	Sim
Paciente 15	1,77	4,35	Positivo	Positivo	3	Sim
Paciente 16	2,53	2,96	Positivo	Positivo	3	Sim
Paciente 17	1,05	1,27	Negativo	Positivo	3	Não
Controle 18	0,92	1,14	Negativo	N/A	N/A	Não
Controle 19	1,17	1,03	Negativo	N/A	N/A	Sim
Controle 20	3,2	1,4	Positivo	N/A	N/A	Não
Controle 22	1,11	1,87	Positivo	N/A	N/A	Não
Controle 23	0,95	1,31	Negativo	N/A	N/A	Não
Controle 24	1,16	1,03	Negativo	N/A	N/A	Sim
Controle 25	0,88	1,06	Negativo	N/A	N/A	Não
Controle 26	1,27	1,73	Negativo	N/A	N/A	Não

Dos oito pacientes que apresentaram BAT positivo, seis pacientes realizaram testes cutâneos, sendo estes positivo, sete pacientes apresentaram reação inicial grave grau 3 e seis pacientes tinham antecedentes de atopia. Dois controles apresentaram BAT positivo, porém sem correlação com antecedente de atopia, ao contrário da tendência demonstrada no grupo de pacientes.

Realizamos ainda uma análise de subgrupo envolvendo apenas os pacientes com testes cutâneos positivos (11 pacientes), para avaliar se haveria uma melhora da sensibilidade do teste. O BAT foi positivo em 6 pacientes deste subgrupo. Houve melhora da sensibilidade tanto para CD63 quanto para CD203C, porém sem significância estatística. Neste subgrupo de pacientes o CD203c foi positivo em 6 pacientes (sensibilidade de 54,5% e especificidade de 87,5%) e o CD63 em 5 pacientes (sensibilidade de 45% e especificidade de 75%).

## 6. Discussão

Em nosso estudo analisamos a aplicação e relevância do BAT como biomarcador no diagnóstico de RH imediatas aos taxanos, em especial, ao paclitaxel. Apresentamos a análise dos resultados do BAT em 15 pacientes diagnosticados com RH imediata a taxanos, Graus 2 e 3 de gravidade, e em 8 voluntários saudáveis, sendo essa a maior casuística de pacientes analisados com BAT para taxanos.

As pacientes do sexo feminino com diagnóstico de câncer de ovário foram predominantes em nosso estudo, representando quase 50% dos casos. O sexo feminino já é um fator de risco conhecido para as RHMI em geral, porém nossa casuística não tem o número de participantes suficiente para afirmar que o sexo feminino seja um fator de risco independente para reações anafiláticas aos taxanos. Também não existem dados suficientes para afirmar que o câncer de ovário é um fator de risco para essas reações. A atopia estava presente em 60% dos pacientes e em 60% dos indivíduos do grupo controle. Dos oito pacientes que apresentaram BAT positivo, seis pacientes apresentavam antecedentes de alergia, mostrando uma tendência de correlação entre BAT positivo e antecedentes de alergia.

No presente estudo, a maioria das RH iniciais ocorreram entre a primeira e segunda infusões, dado similar ao que já foi reportado em outros estudos da literatura. Como já foi mencionado na introdução, os mecanismos responsáveis pelas RH imediata aos taxanos ainda não estão totalmente esclarecidos. O fato das reações aos taxanos ocorrerem em sua maioria na primeira-infusão, sem exposição prévia e sensibilização ao medicamento, levou a formulação da hipóteses de que mecanismos não IgE mediados possam estar envolvidos, como a ativação do complemento e formação de anafilatoxinas, ou ativação direta de mastócitos e basófilos (PICARD; CASTELLS, 2015).

Estudos *in vitro* com os solventes usados na formulação dos taxanos demonstraram que o Cremophor EL sozinho desencadeou a ativação do complemento na mesma proporção que o Cremophor EL associado ao paclitaxel, sugerindo que o Cremophor EL tenha sido o responsável pela RH imediata (SZEBENI; MUGGIA; ALVING, 1998). Da mesma forma, docetaxel com o polissorbato 80 e polissorbato 80 sozinho demonstraram causar ativação do complemento *in vitro* (WEISZHÁR; CZÚCZ; RÉVÉSZ; ROSIVALL

*et al.*, 2012). Tanto Cremophor EL quanto polissorbato 80 poderiam ser os responsáveis por desencadear as RH, porém esta hipótese ainda não foi demonstrada *in vivo*, conforme já comentado.

A possibilidade de um mecanismo mediado por IgE foi evidenciada mais recentemente. Prieto García e colaboradores descreveram o primeiro caso na literatura, em 2010, de RH imediata grau 3 por paclitaxel com testes cutâneos positivos para paclitaxel e negativos para o solvente (PRIETO GARCÍA ; PINEDA DE LA LOSA, 2010). A partir deste relato, Picard e colaboradores realizaram testes cutâneos em 145 pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade a taxanos, sendo 103 (71%) positivos. Pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade grau 2 e 3 apresentaram número significativamente maior de testes cutâneos positivos. Pacientes com testes cutâneos positivos apresentaram maior incidência de vermelhidão em face (*flushing*) quando comparado com pacientes que apresentaram testes negativos (86% vs. 64%,  $p=0,02$ ) (PICARD; PUR; CAIADO; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2016). O teste cutâneo, assim como o grau da reação inicial foram utilizados para fazer a estratificação do risco do paciente assim como para a definição do protocolo de dessensibilização. A grande maioria dos pacientes toleram a reexposição a taxanos, seja por dessensibilização, seja por provocação. Uma das desvantagens dos testes cutâneos é que estes devem ser realizados no mínimo após duas semanas da reação, o que pode retardar o tratamento. (PICARD; PUR; CAIADO; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2016)

Pagani e colaboradores também avaliaram o papel dos testes cutâneos de leitura imediata para taxanos em um estudo multicêntrico, no qual 84 pacientes que apresentaram RH a taxanos foram avaliados. Os pacientes que apresentaram RH grau 3 apresentaram maior positividade dos testes cutâneos comparados aos que apresentaram reações grau 1 e 2 (28,6% vs. 10,7%;  $p=0,038$ ). Pacientes com testes positivos também apresentaram maior frequência de sintomas cutâneos. Todos os pacientes do grupo controle apresentaram testes cutâneos negativos, caracterizando uma baixa sensibilidade do teste (8,7% - 24,6%) com alta especificidade (100%) (PAGANI; BAVBEK; DURSUN; BONADONNA *et al.*, 2019).

Com base nos dados acima descritos, infere-se que as reações mediadas por IgE são mais prováveis entre pacientes que apresentaram reações graves e sintomas cutâneos (PAGANI; BAVBEK; DURSUN; BONADONNA *et al.*, 2019; PICARD; PUR;



CAIADO; GIAVINA-BIANCHI *et al.*, 2016). Para os casos em que existe suspeita de reação IgE mediada e a reação ocorreu na primeira infusão foi feita a hipótese de que a sensibilização tenha ocorrido anteriormente, através de reação cruzada com outras fontes de exposição ambiental, uma vez que o paclitaxel e os precursores do docetaxel (bacatina III e 3-desacetilbacatina III) são isolados de diferentes espécies de árvores da espécie Teixos, em diferentes partes da planta, incluindo seu pólen (VANHAELEN; DUCHATEAU; VANHAELEN-FASTRÉ; JAZIRI, 2002). Nossa casuística é composta por 15 pacientes que apresentaram anafilaxia com taxanos, todos com sintomas cutâneos, sendo que 11 deles apresentaram testes cutâneos positivos, ou seja, um grupo de pacientes com maior probabilidade de ter uma reação IgE mediada como causa da anafilaxia.

Sabemos também que os resultados do BAT variam de acordo com a classe do medicamento estudado e o mecanismo da RHMI envolvido, e tem resultados mais consistentes e promissores em RHMI mediada por IgE (ex. pirazolona, reatores seletivos, bloqueadores neuromusculares, beta-lactâmicos e compostos de platina). (CAMPOS; GALVÃO; KALIL; CASTELLS *et al.*, 2019). Em nosso estudo, o BAT apresentou positividade em 8 dos 15 pacientes testados (53%). Houve aumento de expressão de CD203c em 8/15 (53%) pacientes e de CD 63 em 5/15 (40%) pacientes, respectivamente. A baixa sensibilidade do BAT para taxanos nos nossos pacientes, nos levou a realizar uma análise de subgrupo, apenas com pacientes que realizaram os testes cutâneos sendo estes positivos, na tentativa de ter um grupo ainda mais homogêneo de pacientes. Na análise deste subgrupo de pacientes (11 pacientes), CD203c foi positivo em 6 pacientes (sensibilidade de 54,5% e especificidade de 87,5%) e CD63 em 5 pacientes (sensibilidade de 45% e especificidade de 75%). A sensibilidade do BAT neste subgrupo de pacientes com maior probabilidade de RH com mecanismo mediado pela IgE, com testes cutâneos positivos, apresentou um aumento, porém não significativo versus a análise inicial. A expressão aumentada de CD203c foi mais frequente do que CD63 nos pacientes com resultados de testes positivos, concluindo-se que a sensibilidade deste biomarcador aumenta em pacientes com teste cutâneo positivo, ou seja, pacientes com endótipo de reação IgE mediada.

O grupo controle formado por voluntários sadios que nunca haviam se exposto aos taxanos apresentaram alguns testes positivos, tanto na expressão de CD63 quanto de CD203c. Esses resultados sugerem que possa existir mais de uma forma de estimulação

dos basófilos pelos taxanos, algumas dependentes de sensibilização, outras não. Como já foi citado, os taxanos são substâncias derivadas de plantas e existe a hipótese de uma reação cruzada entre o seixo e os quimioterápicos dessa classe, com possível sensibilização prévia destes indivíduos. Imunoglobulina (Ig) G específica para paclitaxel foi encontrado no soro de 8,8% de 63 doadores de sangue saudáveis da Bélgica (onde a planta *Taxus baccata* está disseminada), apesar de nunca terem sido expostos ao medicamento. Entre os doadores de sangue atópicos (definidos como sensibilizados à espécie *Betula*), esse percentual aumentou para 21,4%. Em contraste, IgGs específicas para paclitaxel não foram detectadas em 50 doadores de sangue saudáveis do hemisfério sul (onde os teixos não crescem). Há evidências em alguns pacientes reativos à protamina, que IgGs específicas contra medicamentos (em combinação com complemento) podem mediar RH imediatas. Embora este mecanismo não tenha sido explorado em reações anafiláticas por taxanos, pode mostrar-se relevante no futuro. Outra possibilidade é que IgE específica para paclitaxel seja produzida em pacientes expostos ao pólen do teixo. Os controles que apresentaram BAT positivo para taxanos poderiam ter se sensibilizado mesmo sem exposição prévia ao fármaco. Os solventes também podem desencadear a ativação do complemento em indivíduos saudáveis e, assim, causar RH imediata através da produção de anafilatoxinas, ou induzir a liberação de histamina e outros mediadores por um efeito direto, mas indefinido, de paclitaxel e docetaxel em basófilos/mastócitos em indivíduos saudáveis. Uma amostra com maior número de pacientes será necessária para avaliação destas hipóteses, assim como testes específicos para confirmação da sensibilização prévia.

O BAT pode vir a ser uma ferramenta diagnóstica útil para o diagnóstico de anafilaxia a taxanos, principalmente em pacientes com fenótipos e endótipos específicos, e naqueles com RH imediata grave, quando o diagnóstico não pode ser estabelecido a partir do teste cutâneo e um resultado de BAT positivo é observado.

## 7. Conclusões

Por meio dos achados do nosso estudo pudemos observar que:

- O BAT pode auxiliar no diagnóstico dos pacientes com reação de hipersensibilidade imediata aos taxanos.
- O BAT para taxanos apresentou uma sensibilidade de 53% e a especificidade de 87%, podendo ser usado como método de diagnóstico complementar para pacientes que apresentaram reação de hipersensibilidade aos taxanos.
- O BAT para taxanos apresentou sensibilidade de 33% e especificidade de 88% para CD63 e sensibilidade de 53% e especificidade de 87% para CD203c.
- Neste subgrupo de pacientes com testes cutâneos positivos, a sensibilidade do BAT foi de 54,5% e especificidade de 87,5%
- A expressão da proteína CD203c apresentou maior sensibilidade no diagnóstico de pacientes com reação de hipersensibilidade imediata aos taxanos em relação ao CD63

## 8. Referências Bibliográficas

BOOKMAN, M. A.; KLOTH, D. D.; KOVER, P. E.; SMOLINSKI, S. *et al.* Intravenous prophylaxis for paclitaxel-related hypersensitivity reactions. **Semin Oncol**, 24, n. 6 Suppl 19, p. S19-13-S19-15, Dec 1997.

BROWN, S. G. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. **J Allergy Clin Immunol**, 114, n. 2, p. 371-376, Aug 2004.

BÜHRING, H. J.; SEIFFERT, M.; GIESERT, C.; MARXER, A. *et al.* The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. **Blood**, 97, n. 10, p. 3303-3305, May 2001.

BÜHRING, H. J.; SIMMONS, P. J.; PUDNEY, M.; MÜLLER, R. *et al.* The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. **Blood**, 94, n. 7, p. 2343-2356, Oct 1999.

CAIADO, J.; PICARD, M. Diagnostic tools for hypersensitivity to platinum drugs and taxanes: skin testing, specific IgE, and mast cell/basophil mediators. **Curr Allergy Asthma Rep**, 14, n. 8, p. 451, Aug 2014.

CAMPOS, L.; GALVÃO, V. R.; KALIL, J.; CASTELLS, M. *et al.* BAT in the Diagnosis of Drug Allergy: a Novel Tool in Clinical Daily Practice? **Curr Allergy Asthma Rep**, 19, n. 4, p. 20, 03 2019.

CASTELLS, M. Diagnosis and management of anaphylaxis in precision medicine. **J Allergy Clin Immunol**, 140, n. 2, p. 321-333, Aug 2017.

CASTELLS, M. C. Hypersensitivity to antineoplastic agents. **Curr Pharm Des**, 14, n. 27, p. 2892-2901, 2008.

CASTELLS, M. C. Drug Allergy: Phenotypes, Endotypes, and Biomarkers. **J Allergy Clin Immunol Pract**, 5, n. 3, p. 626-627, 2017 May - Jun 2017.

CASTELLS, M. C.; TENNANT, N. M.; SLOANE, D. E.; HSU, F. I. *et al.* Hypersensitivity reactions to chemotherapy: outcomes and safety of rapid desensitization in 413 cases. **J Allergy Clin Immunol**, 122, n. 3, p. 574-580, Sep 2008.

DEMOLY, P.; ADKINSON, N. F.; BROCKOW, K.; CASTELLS, M. *et al.* International Consensus on drug allergy. **Allergy**, 69, n. 4, p. 420-437, Apr 2014.

DEMOLY, P.; CASTELLS, M. Important questions in drug allergy and hypersensitivity: consensus papers from the 2018 AAAAI/WAO international drug allergy symposium. **World Allergy Organ J**, 11, n. 1, p. 42, 2018.

ESSAYAN, D. M.; KAGEY-SOBOTKA, A.; COLARUSSO, P. J.; LICHTENSTEIN, L. M. *et al.* Successful parenteral desensitization to paclitaxel. **J Allergy Clin Immunol**, 97, n. 1 Pt 1, p. 42-46, Jan 1996.

ESSAYAN, D. M.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M. Paclitaxel hypersensitivity revisited. **J Clin Oncol**, 14, n. 3, p. 1042, Mar 1996.

GENNARI, A.; GUARNERI, V.; LANDUCCI, E.; ORLANDINI, C. *et al.* Weekly docetaxel/paclitaxel in pretreated metastatic breast cancer. **Clin Breast Cancer**, 3, n. 5, p. 346-352, Dec 2002.

GIAVINA-BIANCHI, P.; GALVAO, V. R.; PICARD, M.; CAIADO, J. *et al.* Basophil Activation Test is a Relevant Biomarker of the Outcome of Rapid Desensitization in Platinum Compounds-Allergy. **J Allergy Clin Immunol Pract**, 5, n. 3, p. 728-736, May - Jun 2017.

GIAVINA-BIANCHI, P.; PATIL, S. U.; BANERJI, A. Immediate Hypersensitivity Reaction to Chemotherapeutic Agents. **J Allergy Clin Immunol Pract**, 5, n. 3, p. 593-599, 2017 May - Jun 2017.

GRADISHAR, W. J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. **Expert Opin Pharmacother**, 7, n. 8, p. 1041-1053, Jun 2006.

INCA, B. **Estimate/2020 – Cancer Incidence in Brazil**. COORDENAÇÃO DE ENSINO Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica ed. Brazil: 2019. 120p p.

JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **J Allergy Clin Immunol**, 113, n. 5, p. 832-836, May 2004.

KLEINE-TEBBE, J.; ERDMANN, S.; KNOL, E. F.; MACGLASHAN, D. W. *et al.* Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. **Int Arch Allergy Immunol**, 141, n. 1, p. 79-90, 2006.

KNOL, E. F.; MUL, F. P.; JANSEN, H.; CALAFAT, J. *et al.* Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. **J Allergy Clin Immunol**, 88, n. 3 Pt 1, p. 328-338, Sep 1991.

KOROSEC, P.; TURNER, P. J.; SILAR, M.; KOPAC, P. *et al.* Basophils, high-affinity IgE receptors, and CCL2 in human anaphylaxis. **J Allergy Clin Immunol**, 140, n. 3, p. 750-758.e715, Sep 2017.

KRIS, M. G.; O'CONNELL, J. P.; GRALLA, R. J.; WERTHEIM, M. S. *et al.* Phase I trial of taxol given as a 3-hour infusion every 21 days. **Cancer Treat Rep**, 70, n. 5, p. 605-607, May 1986.

LEVINE, B. B. Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. **N Engl J Med**, 275, n. 20, p. 1115-1125, Nov 17 1966.

MARKMAN, M.; KENNEDY, A.; WEBSTER, K.; ELSON, P. *et al.* Clinical Features of Hypersensitivity Reactions to Carboplatin. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, 17, n. 4, 1999 Apr 1999.

MARKMAN, M.; KENNEDY, A.; WEBSTER, K.; KULP, B. *et al.* Paclitaxel-associated Hypersensitivity Reactions: Experience of the Gynecologic Oncology Program of the Cleveland Clinic Cancer Center. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, 18, n. 1, 2000 Jan 2000.

MARKMAN, M.; KENNEDY, A.; WEBSTER, K.; PETERSON, G. *et al.* Simplified regimen for the prevention of paclitaxel-associated hypersensitivity reactions. **J Clin Oncol**, 15, n. 12, p. 3517, Dec 1997.

MONNERET, G.; GUTOWSKI, M. C.; BIENVENU, J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. **Clin Exp Immunol**, 115, n. 3, p. 393-396, Mar 1999.

P. DEMOLY, N. F. A. K. B. M. C. International Consensus on drug allergy - Demoly - 2014 - Allergy - Wiley Online Library. 2020.

PAGANI, M.; BAVBEK, S.; DURSUN, A. B.; BONADONNA, P. *et al.* Role of Skin Tests in the Diagnosis of Immediate Hypersensitivity Reactions to Taxanes: Results of a Multicenter Study. **J Allergy Clin Immunol Pract**, 7, n. 3, p. 990-997, 03 2019.

PICARD, M.; CASTELLS, M. C. Re-visiting Hypersensitivity Reactions to Taxanes: A Comprehensive Review. **Clin Rev Allergy Immunol**, 49, n. 2, p. 177-191, Oct 2015.

PICARD, M.; MATULONIS, U. A.; CASTELLS, M. Chemotherapy hypersensitivity reactions in ovarian cancer. **J Natl Compr Canc Netw**, 12, n. 3, p. 389-402, Mar 2014.

PICARD, M.; PUR, L.; CAIADO, J.; GIAVINA-BIANCHI, P. *et al.* Risk stratification and skin testing to guide re-exposure in taxane-induced hypersensitivity reactions. **J Allergy Clin Immunol**, 137, n. 4, p. 1154-1164.e1112, Apr 2016.

PICCART, M. J.; GORE, M.; TEN BOKKEL HUININK, W.; VAN OOSTEROM, A. *et al.* Docetaxel: an active new drug for treatment of advanced epithelial ovarian cancer. **J Natl Cancer Inst**, 87, n. 9, p. 676-681, May 1995.

PIVOT, X.; KORALEWSKI, P.; HIDALGO, J. L.; CHAN, A. *et al.* A multicenter phase II study of XRP6258 administered as a 1-h i.v. infusion every 3 weeks in taxane-resistant metastatic breast cancer patients. **Ann Oncol**, 19, n. 9, p. 1547-1552, Sep 2008.

PRIETO GARCÍA, A.; PINEDA DE LA LOSA, F. Immunoglobulin E-mediated Severe Anaphylaxis to Paclitaxel. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 20(2): 170 p. 2010.

RIEDER, M. Immune Mediation of Hypersensitivity Adverse Drug Reactions: Implications for Therapy. **Expert opinion on drug safety**, 8, n. 3, 2009 May 2009.

SIMONS, F. E.; ARDUSSO, L. R.; DIMOV, V.; EBISAWA, M. *et al.* World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 update of the evidence base. **Int Arch Allergy Immunol**, 162, n. 3, p. 193-204, 2013.

SYRIGOU, E.; DANNOS, I.; KOTTEAS, E.; MAKRILIA, N. *et al.* Hypersensitivity reactions to docetaxel: retrospective evaluation and development of a desensitization protocol. **Int Arch Allergy Immunol**, 156, n. 3, p. 320-324, 2011.

SZEBENI, J.; MUGGIA, F. M.; ALVING, C. R. Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study. **J Natl Cancer Inst**, 90, n. 4, p. 300-306, Feb 1998.

VANHAELEN, M.; DUCHATEAU, J.; VANHAELEN-FASTRÉ, R.; JAZIRI, M. Taxanes in *Taxus baccata* pollen: cardiotoxicity and/or allergenicity? **Planta Med**, 68, n. 1, p. 36-40, Jan 2002.

WEISS, R. B.; DONEHOWER, R. C.; WIERNIK, P. H.; OHNUMA, T. *et al.* Hypersensitivity reactions from taxol. **J Clin Oncol**, 8, n. 7, p. 1263-1268, Jul 1990.

WEISZHÁR, Z.; CZÚCZ, J.; RÉVÉSZ, C.; ROSIVALL, L. *et al.* Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. **Eur J Pharm Sci**, 45, n. 4, p. 492-498, Mar 2012.

WIERNIK, P. H.; SCHWARTZ, E. L.; STRAUMAN, J. J.; DUTCHER, J. P. *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. **Cancer Res**, 47, n. 9, p. 2486-2493, May 1987.

YAMAMOTO, S.; MAEDA, N.; NAGASHIMA, Y.; KUBO, H. *et al.* A phase II, multicenter, single-arm study of tri-weekly low-dose nanoparticle albumin-bound paclitaxel chemotherapy for patients with metastatic or recurrent breast cancer. **Breast Cancer**, 24, n. 6, p. 783-789, Nov 2017.