

Avaliação da expressão dos marcadores CD63 e CD203c em basófilos e do seu contributo no diagnóstico de hipersensibilidade ao diclofenac

Basophil activation tests using CD63 and CD203c expression in patients with diclofenac hypersensitivity

Data de recepção / Received in: 26/12/2013

Data de aceitação / Accepted for publication in: 05/06/2013

Rev Port Imunoalergologia 2014; 22 (3): 195-205

Teresa Moscoso^{1,2}, Alcinda Campos Melo¹, Marta Neto², Maria Conceição Pereira Santos¹

¹ Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Universidade de Lisboa

² Serviço de Imunoalergologia, Hospital Pulido Valente, Centro Hospitalar Lisboa Norte

RESUMO

Introdução: O grupo dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) é um dos grupos farmacológicos que coloca maior dificuldade no diagnóstico de hipersensibilidade, uma vez que grande parte dos testes não se encontram validados. Os métodos de avaliação da expressão de moléculas da superfície dos basófilos por citometria de fluxo após activação induzida por fármacos têm sido referidos como uma possível mais-valia no diagnóstico destas reacções.

Objectivo: Avaliar a eficácia diagnóstica do teste de activação de basófilos (TAB) em doentes com história de hipersensibilidade imediata ao diclofenac. **População e métodos:** 17 doentes (M: 4, F: 13; idade média: $42,9 \pm 13,7$ anos) com história de hipersensibilidade ao diclofenac. Como controlo foram incluídos 11 voluntários saudáveis (M: 4, F: 7; idade média: $44,3 \pm 18,7$ anos) sem história de hipersensibilidade a AINEs. Foi realizado o TAB com diferentes abordagens na identificação da população de basófilos: Flow2 CAST[®] que utiliza CCR3, Basotest[®] – IgE, e o Basotest[®] modificado – HLA-DR⁻/CD123⁺. A avaliação da activação foi efectuada por citometria de fluxo, quantificando a expressão *de novo* de CD63 e *up regulation* de CD203c. **Resultados:** Foram comparados diferentes marcadores usados na identificação de basófilos, nomeadamente expressão de CCR3, IgE e CD123 na ausência de HLA-DR, em que se

obteve uma sensibilidade (S) de 40%, 13% e 77%, respectivamente, e especificidade (E) de 91% para todos. Na avaliação da activação induzida pelo fármaco a análise de citometria de fluxo foi baseada na percentagem e/ou intensidade de expressão, obtendo-se uma S de 40% e 77%, e uma E de 91% para as moléculas CD63 e CD203c, respectivamente. **Conclusões:** Obteve-se uma maior sensibilidade através da expressão de CD203c em relação à obtida com os resultados da expressão de CD63. Estes dados sugerem que o TAB poderá ser considerado um método complementar no diagnóstico em doentes com hipersensibilidade ao diclofenac.

Palavras-chave: Activação de basófilos, CD203c, CD63, citometria de fluxo, hipersensibilidade a AINEs.

ABSTRACT

Background: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) represent a difficult group in what concerns hypersensitivity diagnosis, since most of the tests are not validated. The evaluation of the basophils surface molecules expression following activation by drugs has been described as a possible and useful tool for diagnosis of this kind of reactions. **Objective:** To evaluate the clinical usefulness of basophil activation test (BAT) in immediate diclofenac hypersensitivity reactions diagnosis. **Patients and methods:** 17 patients (M: 4, F: 7; mean age: 44.3 ± 18.7 years) with diclofenac hypersensitivity were studied. 11 healthy volunteers (M: 4, F: 7; mean age: 44.3 ± 18.7 years) without history of NSAIDs hypersensitivity were used as control group. BAT was carried out using different approaches for basophils identification: Flow2 CAST[®] method using CCR3, Basotest[®] – IgE, and the Basotest[®] modified – HLA-DR/CD123 +. Basophil activation markers CD63 and CD203c were used, quantifying the expression of “new” CD63 and the “up regulation” of CD203c. **Results:** Comparing different markers for basophils identification, namely CCR3, IgE and CD123 expression in the absence of HLA-DR, we obtained a sensitivity of 40%, 13% and 77% for this order, and a specificity of 91% for all. In the evaluation of drug-induced activation, the flow cytometry analysis was based on the percentage and/or intensity of expression, yielding 40% and 77% of sensitivity and 91% of specificity, for CD63 and CD203c molecules, respectively. **Conclusions:** The test using CD63 showed lower sensitivity compared with the test using CD203c. These results suggest that BAT can be considered a complementary diagnosis tool for patients with diclofenac hypersensitivity.

Keywords: Basophils activation test, CD203c, CD63, flow cytometry, NSAIDs hypersensitivity.

INTRODUÇÃO

As reacções de hipersensibilidade a fármacos são comuns na prática clínica, correspondendo a cerca de 15% da totalidade das reacções adversas a fármacos¹. De acordo com as normas de nomenclatura publicadas pela *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI), dividem-se em reacções imunológi-

cas ou alérgicas (IgE e não IgE mediadas) e reacções sem mecanismo imunológico subjacente, ou não alérgicas².

O mecanismo responsável pelas reacções adversas a anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) está ainda pouco esclarecido. A possibilidade de uma reacção IgE mediada deve ser considerada em doentes com hipersensibilidade selectiva a um único fármaco, sendo que a reacção a mais do que um fármaco de diferentes grupos

farmacológicos poderá ser justificada pela inibição da ciclooxigenase tipo I (COX-1)³, apesar de outros mecanismos poderem também estar envolvidos⁴.

Em relação ao tempo que decorre entre a toma do fármaco e a reacção, estas são classificadas de imediatas, quando ocorrem até 1 hora após a sua administração, ou não imediatas ocorrendo num tempo > 1 hora².

De acordo com as normas do *European Network for Drug Allergy* (ENDA) e *EAACI interest group on drug hypersensitivity*, os procedimentos diagnósticos no caso de suspeita de reacção de hipersensibilidade imediata a fármacos baseiam-se numa história clínica detalhada seguida de testes cutâneos por picada (TCP), quando disponíveis e validados⁵, testes laboratoriais e prova de provocação oral controlada⁶, que, apesar dos riscos associados, é considerado o método de eleição no diagnóstico.

O grupo dos AINEs é um dos grupos farmacológicos que coloca maior dificuldade na confirmação diagnóstica. Como os testes cutâneos e os habituais testes *in vitro* não estão ainda devidamente padronizados e validados, nestes casos é necessário muitas vezes recorrer a uma prova de provocação. Neste sentido, será muito importante melhorar a avaliação *in vitro* tornando-a uma ferramenta útil para o diagnóstico. Os métodos de avaliação da expressão de marcadores de superfície dos basófilos (por citometria de fluxo), nomeadamente CD63 e/ou CD203c após activação induzida por fármacos, têm sido referidos como uma possível mais-valia no diagnóstico deste tipo de reacções^{7,8}.

A utilidade do teste de activação de basófilos (TAB) pela expressão de CD63 já se encontra amplamente demonstrada, nomeadamente nas reacções IgE mediadas a alergénios inalantes comuns, alergénios alimentares, látex e veneno de himenópteros, com elevadas sensibilidade e especificidade⁹⁻¹¹. No âmbito da alergia medicamentosa é utilizado em reacções de hipersensibilidade imediata, principalmente para fármacos cuja quantificação da IgE específica não se encontra disponível. Gamboa e colaboradores¹² consideram o TAB um método de diagnóstico *in vitro* reprodutível, com elevada especificidade (>90%)

e sensibilidade (60-70%) no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade a AINEs, apresentando uma boa correlação com as provas de provocação positivas. Num estudo mais recente, utilizando um painel de AINEs (aspirina, diclofenac e naproxeno), foram obtidos resultados semelhantes de sensibilidade e especificidade, concluindo que resultados negativos no TAB não permitem excluir o diagnóstico e que resultados positivos associados a uma história compatível poderão confirmar o diagnóstico, dispensando a realização de prova de provocação¹³.

A molécula CD63 (glicoproteína 53), membro da família *tetraspan*, que surge *de novo* após desgranulação dos basófilos, revela boa correlação com a libertação de histamina após estimulação inespecífica (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina-fMLP), anticorpo anti-IgE ou alergénios¹⁴.

Mais recentemente tem sido utilizada a molécula CD203c, específica de basófilos, e um antígeno neural E-NPP3 (ectonucleotido pirofosfatase / fosfodiesterase 3) que não se encontra expressa noutras células do sangue periférico^{15,16}. Esta molécula sofre uma *up regulation* em resposta a alergénios específicos, podendo ser utilizada no diagnóstico no sentido de melhorar a sensibilidade do TAB, como já demonstrado na alergia a veneno de himenópteros¹⁷, pólenes¹⁸ e a alergénios alimentares^{19,20} com alta sensibilidade e especificidade.

Recentemente têm surgido estudos relacionados com o diagnóstico de reacções alérgicas a látex, veneno de himenópteros e fármacos, nomeadamente relaxantes musculares²¹, comparando estes dois marcadores e demonstrando uma maior sensibilidade com a utilização de CD203c^{8,22,23}. No entanto, ainda não foram publicados estudos comparativos da eficácia da expressão destes marcadores no diagnóstico de hipersensibilidade a AINEs.

OBJECTIVOS

1) Avaliar a eficácia diagnóstica do TAB através da utilização de dois marcadores de activação, CD63 e CD203c, com abordagens distintas de identificação da

população de basófilos num grupo de doentes com hipersensibilidade ao diclofenac;

2) Avaliar a influência de factores como o tempo decorrido desde a reacção e o tipo de reacção após contacto com o fármaco no resultado dos testes.

MATERIAL E MÉTODOS

População

Foram seleccionados para este estudo 17 doentes (M: 4/ F: 13; idade média: $42,9 \pm 13,7$ anos) seguidos em consulta de Alergia Medicamentosa do Hospital Pulido Valente, Centro Hospitalar de Lisboa Norte, com história de pelo menos duas reacções de anafilaxia e/ou urticária/angioedema ao diclofenac imediatamente (≤ 1 hora) após toma do mesmo.

Anafilaxia e choque anafilático foram definidos de acordo com os critérios de Sampson²⁴ e urticária quando as manifestações foram apenas cutâneas e descritas como elevações eritematocutâneas pruriginosas, evanescentes à digitopressão, com duração < 24 horas.

Foram excluídos os doentes com história de reacção num período inferior a seis semanas. Em sete casos (41,2%) a reacção ocorreu após 2008 e nos restantes 58,8%, antes desse ano.

Em relação à clínica manifestada durante a reacção, sete apresentaram sintomatologia cutânea (urticária e angioedema) e 10 (58,8%) anafilaxia.

Um grupo de 11 voluntários saudáveis (M: 4/ F: 7; idade média: $44,3 \pm 18,7$ anos) sem história conhecida de hipersensibilidade a AINEs e tolerando diclofenac foi utilizado como controlo. De acordo com a comissão de ética hospitalar, todos os doentes deram consentimento para a inclusão no estudo.

Prova de provocação oral

A prova de provocação oral controlada foi realizada respeitando as orientações publicadas⁶ e sob as condições de vigilância indicadas neste tipo de procedimentos.

Após autorização e assinatura do consentimento informado foram realizadas em hospital de dia 35 provas de provocação oral abertas aos 17 doentes, que suspenderam a toma de anti-histamínicos por um período mínimo de sete dias e a toma de β -bloqueantes no próprio dia.

Teste de activação dos basófilos

Optou-se por avaliar apenas a eficácia do teste para o diclofenac, uma vez que a totalidade dos doentes seleccionados teve reacção com este fármaco, utilizado de acordo com a literatura²⁵ em 2 concentrações distintas (0,94 e 0,23 mg/mL).

Em ambos os grupos o TAB foi realizado utilizando diferentes abordagens na identificação da população de basófilos: método Flow2 CAST[®] (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Suíça) que utiliza o marcador CCR3; o método Basotest[®] (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Alemanha) – IgE; e o método Basotest[®] modificado – HLA-DR⁺/CD123⁺. Como marcadores de activação foram avaliados os níveis de expressão de CD63 e CD203c por citometria de fluxo.

Teste de activação dos basófilos

(Flow2 CAST[®]) – citometria de fluxo: CD63

O teste de activação de basófilos foi realizado usando o método Flow2 CAST[®] (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Suíça) de acordo com as instruções do fabricante. A 50 μ l de sangue total heparinizado adicionaram-se 50 μ l de cada uma das concentrações dos fármacos, 50 μ l do péptido quimiotáctico N-formil-Met-Leu-Phee (FMLP) e 50 μ l de PBS. A cada tubo foram adicionados 100 μ l de tampão de estimulação (IL-3), 20 μ l dos anticorpos monoclonais, anti-CD63-FITC e anti-CCR3-PE seguindo-se uma incubação de 15 minutos a 37°C. Foi posteriormente efectuada a lise dos eritrócitos, lavagem e ressuspensão das células em PBS. A aquisição por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson) e ocorreu nas duas horas a seguir à finalização da técnica.

Teste de activação dos basófilos (Basotest®) – citometria de fluxo: CD63 e CD203c

Basotest® – citometria de fluxo: CD63

O teste de activação de basófilos (Basotest®, ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Alemanha) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. 100 µL de sangue total heparinizado foram incubados com 20 µL do tampão de estimulação (contendo IL-3) durante 10 minutos a 37°C e posteriormente com o fármaco em duas concentrações (0,94 mg/mL e 0,23mg/mL), com N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP – controlo positivo) e com solução de tampão (controlo negativo) durante 20 minutos a 37°C. A interrupção do processo de desgranulação deu-se em gelo, seguida de marcação das células com 2 anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos – anti-CD63-FITC e anti-IgE-PE, lise dos eritrócitos e lavagem das amostras. A aquisição foi feita em citómetro FACSCalibur – Beckton Dickinson® e ocorreu num período máximo de 120 minutos após preparação das amostras.

Basotest® modificado – citometria de fluxo: CD203c

Paralelamente foi realizado o *Basotest®* com algumas modificações no que diz respeito à identificação dos basófilos, utilização da molécula de activação CD203c e quantidade de sangue total heparinizado.

A 200 µL sangue total heparinizado foram adicionados 200 µL do fármaco em duas concentrações, controlo positivo (péptido quimiotáctico N-formil-Met-Leu-Phe: FMLP) e controlo negativo (PBS) seguido de incubação durante 20 minutos a 37°C. A desgranulação foi suspensa colocando as amostras em gelo durante 10 minutos. As células foram em seguida marcadas com: 8 µL de anti-CD63-FITC, 30 µL de anti-CD203-PE, 8 µL anti-HLA-DR PerCP e 8 µL anti-CD123-APC.

Após incubação durante 20 minutos em gelo, foi realizada a lise dos eritrócitos, centrifugação, lavagem e res-suspensão com PBS. Aquisição por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson) ocorreu nas duas horas a seguir à finalização da técnica.

Análise por citometria de fluxo

As amostras processadas foram imediatamente analisadas utilizando o *software* Cell Quest®.

A população de basófilos foi identificada como SS-Clow/CCR3^{high}, anti-IgE^{high} e HLA-DR⁻/CD123⁺, e pelo menos 500 basófilos foram adquiridos por amostra. Para o marcador CD63 os basófilos activados foram identificados como CD63^{high}, sendo o valor basal estabelecido a partir do obtido no controlo negativo (< 5%). Foi considerado um número mínimo de 150 basófilos activados para validar os testes.

Os critérios de positividade para o Flow2 CAST® com marcador CD63 foram: percentagem de activação ≥ 5% e percentagem de activação após estimulação de pelo menos o dobro da percentagem de basófilos activados espontaneamente (índice de estimulação ≥ 2), sendo que este critério não é referido na literatura por alguns grupos^{21,26}.

Para o marcador CD203c pelo método *Basotest®* modificado foi determinado um valor de activação de 59 após realização de curvas ROC. A sua expressão traduz-se em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística

Os dados relativos à história clínica, testes *in vivo* e *in vitro* foram introduzidos numa base do programa estatístico SPSS para cálculo de curvas ROC e determinação de *p values* pelo programa estatístico R.

O teste de χ^2 foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis qualitativas e o teste exacto de Fisher quando o tamanho das amostras independentes foi pequeno, número de casos inferior a cinco.

Para cada curva ROC foi determinado um valor de *cut off* correspondendo ao ponto que melhor discriminava entre presença e ausência de doença. Determinou-se a sensibilidade (S), especificidade (E) e valores preditivos (Vp) com intervalo de confiança (IC) de 95% para os diferentes métodos e marcadores utilizados.

RESULTADOS

Prova de provocação oral

Das 35 provas de provocação oral abertas realizadas, 15 (43%) foram positivas, encontrando-se no Quadro I discriminados os fármacos utilizados e os resultados obtidos.

Teste de activação dos basófilos

(Flow2 CAST®) – citometria de fluxo: CD63

Aos 17 doentes e 11 controlos foi realizado o TAB para o diclofenac pelo método Flow2 CAST®. Do grupo de doentes foram inicialmente excluídos dois resultados: um por apresentar índice de activação do controlo positivo com FMLP inferior ao valor obtido pelo controlo negativo, *non responder* (5,5%), outro por não ter sido

possível adquirir o número mínimo de basófilos necessário para validar o teste.

Dos restantes 15 doentes, seis (40,0%) e um controlo (9,1%) apresentaram testes positivos.

A sensibilidade ao diclofenac obtida com este teste foi de 40,0%, E: 90,9%, VPP: 85,7% e VPN: 52,6%.

Relacionando o tempo decorrido entre a última reacção ao fármaco e a positividade do teste avaliado por este método, verificou-se uma diminuição da sensibilidade com o afastamento da data da reacção (reacção após 2008 S: 83,3% e E: 50,0%) em comparação com reacção ocorrida antes de 2008 (S: 11,1% e E: 88,9%).

Verificámos também não existir diferença estatisticamente significativa entre o tipo de reacção (anafilaxia vs. reacção cutânea) e a positividade dos testes ($p = 0,6224$) (Quadros 2 e 3).

Quadro I. Identificação dos doentes e resultados das provas de provocação oral realizadas

Doente	Sexo	Idade	Reacção inicial com D	Tempo desde última reacção (anos)	Fármacos envolvidos na reacção	Prova de provocação oral positiva	Prova de provocação oral negativa
1	F	45	A	> 3	AAS, D, Ib, N	N	E
2	F	30	A	< 3	D, AAS	AAS	N
3	F	56	A	> 3	D	D	N, AAS
4	F	67	A	> 3	N, D, AAS, Ib		E
5	F	50	A	> 3	N, D, AAS, Ib		E, N
6	F	39	A	> 3	AAS, D, Ib		N
7	F	37	A	< 3	AAS, D, Ib, N	N	E
8	M	23	A	> 3	AAS, D, Ib		N
9	F	61	U/AE	> 3	AAS, D, Ib	AAS, Ib	N
10	F	33	A	> 3	N, D, AAS, Ib		E
11	F	38	A	< 3	D	D	AAS
12	M	25	U/AE	> 3	AAS, D, Ib	AAS, D	N
13	F	65	U/AE	< 3	AAS, D, Ib, P	AAS, P	N
14	M	23	U/AE	< 3	D	D	N, AAS
15	F	52	U/AE	< 3	D, Ib	AAS	N
16	M	46	U/AE	> 3	Ib, Mt, AAS, D	AAS	N
17	F	40	U/AE	< 3	D, Ib, Mt	AAS	N

A: anafilaxia; AE: angioedema; AAS: ácido acetilsalicílico; D: diclofenac; E: etoricoxib; F: feminino; Ib: ibuprofeno; M: masculino; Mt: metamizol; N: nimesulide; P: paracetamol; U: urticária

**Teste de activação dos basófilos (Basotest®)
– citometria de fluxo: CD63 e CD203c**

Basotest® modificado-citometria de fluxo: CD203c

O TAB pelo método do Basotest® modificado, foi realizado nos 17 doentes e nos 11 controlos.

Com os valores de activação obtidos com o marcador CD203c expressos em IMF, foram criadas curvas ROC. A AUC (Area Under the Curve) obtida para o diclofenac foi de 0,854, sendo o valor de corte encontrado de 59 (intervalo entre 57,345-59,715) com sensibilidade de 66,7% e especificidade entre 90,9 e 95,5%.

Dos 17 doentes com história de hipersensibilidade ao diclofenac treze (76,5%) apresentaram resultados posi-

vos, sendo que no grupo controlo um deles (9,1%) obteve resultados acima deste valor de IMF.

Com este método e para o valor de corte estabelecido a S obtida foi de 76,5%, E: 90,9%, VPP: 92,9% e VPN: 71,4%.

Relacionando o tempo que decorreu entre a reacção com o diclofenac e os testes com resultado positivo, utilizando o método Basotest® modificado, não se verificou correlação estatisticamente significativa ($p = 0,8643$), assim como entre o tipo de reacção (anafilaxia vs reacções cutâneas) e a positividade dos testes ($p > 0,05$).

Existe contudo diferença significativa entre a história de reacção e os testes positivos ($p < 0,0001$) (Quadros 2 e 3).

Quadro 2. Resultados do teste de activação dos basófilos com diclofenac – grupo de doentes

Doente	CD63 (Flow2 CAST®)			CD203c (Basotest® modificado)		CD63 (Basotest®)		
	% activação após estimulação com D	IE	Resultado	Valor após estimulação com D (IMF)	Resultado	% activação após estimulação com D	IE	Resultado
1	2,10	0,65	Negativo	62,95	Positivo	15,45	30	Positivo
2	9,00	4,50	Positivo	38,25	Negativo	0,44	–	Negativo
3	–	–	–	101,63	Positivo	4,50	–	Negativo
4	3,45	1,32	Negativo	67,34	Positivo	–	–	Negativo
5	2,88	1,50	Negativo	184,11	Positivo	0,65	–	Negativo
6	8,25	1,90	Negativo	77,33	Positivo	1,46	–	Negativo
7	11,34	4,12	Positivo	61,04	Positivo	3,14	–	Negativo
8	5,86	1,25	Negativo	76,43	Positivo	0,64	–	Negativo
9	7,50	2,34	Positivo	141,28	Positivo	0,18	–	Negativo
10	3,76	4,09	Negativo	31,56	Negativo	0,47	–	Negativo
11	5,2	2,06	Positivo	112,69	Positivo	1,57	–	Negativo
12	1,45	0,97	Negativo	112,17	Positivo	7,03	15	Positivo
13	–	–	–	62,11	Positivo	1,32	–	Negativo
14	36,89	9,10	Positivo	35,80	Negativo	0,44	–	Negativo
15	26,04	5,79	Positivo	104,32	Positivo	1,46	–	Negativo
16	4,62	1,86	Negativo	45,77	Negativo	1,57	–	Negativo
17	5,61	1,60	Negativo	105,49	Positivo	1,17	–	Negativo

A: anafilaxia; AE: angioedema; AAS: ácido acetilsalicílico; D: diclofenac; E: etoricoxib; F: feminino; Ib: ibuprofeno; IE: índice de estimulação; IMF: intensidade média de fluorescência; M: masculino; Mt: metamizol; N: nimesulide; P: paracetamol; U: urticária

Quadro 3. Resultados dos testes de activação dos basófilos com diclofenac – grupo-controlo

Controlo	Sexo	Idade	CD63 (Flow2 CAST®)			CD203c (Basotest®) modificado		CD63 (Basotest®)		
			% activação após estimulação com D	IE	Resultado	Valor após estimulação com D (IMF)	Resultado	% activação após estimulação com D	IE	Resultado
1	F	59	2,77	1,28	Negativo	22,41	Negativo	2,76	–	Negativo
2	M	66	5,64	3,66	Positivo	65,25	Positivo	0,57	–	Negativo
3	M	28	2,49	0,86	Negativo	28,57	Negativo	0,52	–	Negativo
4	F	31	3,20	1,03	Negativo	27,21	Negativo	0,56	–	Negativo
5	M	33	3,17	0,98	Negativo	42,18	Negativo	0,52	–	Negativo
6	F	24	3,49	1,00	Negativo	28,53	Negativo	0,71	–	Negativo
7	M	32	2,52	0,98	Negativo	15,30	Negativo	0,21	–	Negativo
8	F	69	3,17	1,86	Negativo	58,70	Negativo	2,76	–	Negativo
9	F	73	1,90	1,21	Negativo	50,68	Negativo	0,51	–	Negativo
10	F	29	4,56	2,29	Negativo	50,18	Negativo	0,96	–	Negativo
11	F	43	4,21	1,21	Negativo	50,89	Negativo	8,13	11,0	Positivo

D: diclofenac; F: feminino; IE: índice de estimulação; IMF: intensidade média de fluorescência; M: masculino

Basotest® – citometria de fluxo: CD63

Pelo método Basotest® utilizando o marcador de identificação de basófilos IgE, e na mesma população, obtivemos valores de S: 12,5%; E: 90,9%; VPP: 66,7% e VPB: 41,7% (Quadros 2 e 3).

DISCUSSÃO

A necessidade de testes *in vitro* complementares para o diagnóstico de hipersensibilidade aos AINEs, fiáveis e validados, tem levado à abordagem de outras metodologias, nomeadamente o teste de activação dos basófilos com avaliação por citometria de fluxo.

Neste estudo, partindo de uma população de doentes com clínica de hipersensibilidade ao diclofenac, foram encontrados diferentes resultados de TAB de acordo com as metodologias utilizadas quer para a identificação da população de basófilos quer na expressão das moléculas

de activação. Assim, com identificação da população de basófilos pelo marcador CCR3 obtivemos uma sensibilidade de 40% e especificidade de 91%. Com a anti-IgE sensibilidade de 13% atingindo cerca de 80% quando a mesma população foi identificada pela dupla marcação HLA-DR/CD123⁺, sem estimulação prévia com IL-3.

Na literatura, em relação à activação após estimulação com pólen de gramíneas usando como identificação de basófilos IgE ou HLA-DR/CD123⁺, não foram referidas diferenças significativas²⁷.

Estudos recentes utilizando a molécula CD63 revelaram que a IL-3 tem neste contexto um papel relevante⁷, o que está de acordo com os resultados demonstrados neste estudo. A sensibilidade obtida utilizando o marcador CD63 aumentou com a estimulação com a IL-3 de 13% para 40%.

Em relação ao marcador CD203c, estudos anteriores demonstraram não ser necessário a utilização de IL-3⁷, o que está de acordo com os presentes resultados.

De acordo com a literatura²⁸, no que diz respeito aos critérios de positividade, foram utilizadas diferentes abordagens para os definir. Os autores, de acordo com as curvas ROC obtidas, definiram o valor de corte óptimo para a intensidade média de fluorescência com o marcador CD203c, para o diclofenac, de 59. A AUC foi considerada válida para o valor de 0,854. Foram obtidos valores de sensibilidade de 77% e especificidade de 91%. Comparativamente, os resultados obtidos para o CD63 revelaram uma diminuição da sensibilidade (40%), mantendo igual especificidade. No entanto, se considerarmos como referido na literatura²⁶ apenas como critério de positividade a percentagem de activação > 5%, obtemos um valor de sensibilidade de 60%, mantendo uma especificidade de 91%.

Tem sido referida na literatura a utilização de diferentes marcadores de activação no diagnóstico de alergia ao látex⁸, veneno de himenópteros²² e alergia à amoxicilina²³ demonstrando uma mais elevada sensibilidade com o CD203c do que com CD63. Pelo contrário, no diagnóstico de alergia a relaxantes musculares, foram obtidos melhores resultados de sensibilidade com o CD63²⁹. No diagnóstico de alergia ao epitélio de gato ambos os marcadores obtiveram resultados semelhantes³⁰.

Um dos critérios importantes a ter em conta durante a realização do TAB relaciona-se com o tempo que decorre entre a reacção e a realização do teste. Num estudo com relaxantes musculares onde avaliaram esta relação obtiveram valores de sensibilidade de 85% quando o TAB foi realizado num período de 3 anos após a reacção, com diminuição para valores de 47% quando realizado 4 anos após a mesma³¹.

Neste contexto, e do mesmo modo, na avaliação dos nossos resultados utilizando como identificação de população de basófilos o marcador CCR3, verificámos uma diminuição da sensibilidade à medida que aumentava o intervalo de tempo entre a data da reacção e a realização do teste (reacção após 2008 S: 83,3%; antes de 2008 S: 11,1%).

Tendo em conta que um dos factores que pode influenciar a obtenção de resultados negativos é a redução

dos níveis séricos de anticorpo IgE associada ainda à especificidade do mesmo, seria de esperar que, com a redução dos seus níveis ao longo do tempo, ou seja, com o passar do tempo entre a reacção e a realização do teste, um menor valor de sensibilidade seria encontrado³², como ocorreu no presente estudo. Surgiram, no entanto, estudos com resultados contraditórios e sem relação entre o tempo de reacção e a realização do TAB³³.

Por outro lado, o tempo decorrido entre a realização do teste e a aquisição das amostras pode afectar os resultados. Segundo De Weck *et al*, a percentagem de activação de basófilos diminui a partir das 24 horas, podendo conduzir a resultados falsamente negativos às 48 horas, particularmente quando são testados fármacos²⁸. Todas as amostras do presente estudo foram adquiridas nas duas horas a seguir ao seu processamento.

Um outro critério que poderá justificar os diferentes resultados prende-se com o alérgeno utilizado e/ou com as concentrações de fármaco. Neste estudo utilizamos para o diclofenac concentrações de 1 mg/mL e 0,23 mg/mL, semelhantes às utilizadas por outros grupos¹² que obtiveram valores de sensibilidade e especificidade para o mesmo fármaco com o marcador CD63 idênticos (43% e 93%, respectivamente). Por outro lado, alguns trabalhos apresentados utilizaram concentrações um pouco superiores, com resultados menos favoráveis³⁴.

Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a gravidade clínica (anafilaxia vs reacções cutâneas) e a percentagem de activação de basófilos para ambos os marcadores utilizados.

No presente estudo a percentagem de *non responder* foi de 5,5%, estando de acordo com outras casuísticas apresentadas por De Weck e Sanz na qual excede os 4%²⁸, embora alguns autores apontem para valores um pouco superiores³⁵.

Como foi referido, dos 17 doentes apenas 4 realizaram prova de provocação com o diclofenac e os restantes foram incluídos por terem apresentado pelo menos duas reacções imediatas a AINEs, incluindo ao diclofenac. Possivelmente obteríamos resultados mais concordantes se

tivéssemos como critério de inclusão doentes com diagnóstico confirmado por prova de provocação com o diclofenac, mesmo correndo o risco de excluir um número considerável de doentes com história de reacções sistémicas mais graves.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o TAB, embora carecendo de optimização para aplicação regular na prática clínica, poderá ser considerado um método complementar no diagnóstico de doentes com hipersensibilidade aos AINEs. Neste contexto, a expressão de CD203c, sendo um marcador que rapidamente sofre *up-regulation* na presença do alérgeno em doentes sensibilizados, poderá ser considerado uma mais-valia neste diagnóstico, uma vez que revelou melhores resultados de sensibilidade relativamente aos obtidos com o CD63.

Resultados de TAB positivos, utilizando o marcador de activação CD203c, concomitantemente com clínica fortemente sugestiva poderão eventualmente ser suficientes para evitar a realização de prova de provocação oral com o fármaco implicado.

AGRADECIMENTOS

À Inês Filipa Martins, bio-informática da Unidade de Imunologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular pela análise estatística.

Financiamento: Nenhum.

Declaração de conflitos de interesse: Nenhum.

Contacto:

Teresa Moscoso
Serviço de Imunoalergologia do Hospital Pulido Valente
Centro Hospitalar de Lisboa Norte, EPE
Alameda das Linhas Torres, 117, 1769-001 Lisboa
E-mail: teresamoscoso@hotmail.com

REFERÊNCIAS

1. Demoly P, Bousquet J. Epidemiology of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1:305-10.
2. Johansson SGO, Hourihane JOB, Bousquet J, Brujnzeel-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; 56:813-24.
3. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:773-86.
4. Shome GP, Tarbox J, Shearer M, Kennedy R. Cytokine expression in peripheral blood lymphocytes before and after aspirin desensitization in aspirin exacerbated respiratory disease. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28: 706-10.
5. Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler W, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002; 57:45-51.
6. 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; 58:854-63.
7. Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, Groselj-Strele A, Aberer W, Sturm GJ. CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: Characteristics and differences to CD63 up-regulation. *Cytometry Part B* 2010; 78B:308-18.
8. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:259-65.
9. Garcia-Avilés C, Sánchez-López G, Sanz ML, Uasuf C, Diéguez I, Chazot M et al. Flow-cytometric Cellular Allergen Stimulation Test (FAST) in the in vitro diagnosis of food allergy. *Allergy* 2000; 55(Suppl 63):128.
10. Sanz ML, Gamboa PM, Garcia-Aviles MC, Vila L, Dieguez I, Antepara I et al. Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130:33-9.
11. Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1166-71.
12. Gamboa P, Sanz ML, de Weck AL. A new combined test with flow cytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotrienes is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:58-72.
13. 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 diagnostic. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2009; 19:355-69.

14. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; 34:332-9.
15. Buhning HJ, Seiffert M, Giesert C, Marxer A, Kanz L, Valent P, Sano K. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood* 2001; 97:3303-5.
16. Buhning HJ, Simmons PJ, Pudney M, Muller R, Jarrossay D, van Aghthoven A, et al. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94:2343-56.
17. Blinder M, Fierlbeck G, King TP, Valent P, Buhning HJ. Individual hymenoptera-venom compounds induce up regulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD 203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:160-8.
18. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Scherthaner GH, Sperr WR, et al. Recombinant allergens promote expression of CD 203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:102-9.
19. Sato S, Tachimoto H, Shukuya A, Kurosaka N, Yanagida N, Utsunomiya T et al. Basophil activation marker CD 203c is useful in the diagnosis of hen's egg and cow's milk allergies in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 152(suppl 1):54-61.
20. Tokuda R, Nagao M, Hiraguchi Y, Hosoki K, Matsuda T, Kuono K, et al. Antigen-Induced Expression of CD203c on Basophils Predicts IgE-mediated Wheat Allergy. *Allergology International* 2009; 58:193-9.
21. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current application and future perspectives. *Allergy* 2006; 61:1028-39.
22. Eberlein-Konig B, Varga R, Mempel M, Darsow U, Behrendt H, Ring J. Comparison of basophil activation tests using CD 63 or CD 203c expression in patients with insect venom allergy. *Allergy* 2006; 61:1084-5.
23. Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, Gaouar H, Autegarden JE, Leynadier F, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:921-8.
24. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:391-7.
25. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Blanca M, et al and members of the ENDA group. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome. A multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2010; 20:39-57.
26. Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy* 2005; 3:9.
27. Michova A, Abugalia M, Ivanova Ts, Nikolov G; Taskov H, Petrunov B. Comparison of two-flow cytometry methods for basophil degranulation in patients sensitized to grass pollen. *Allergy* 2006; 61:1078-83.
28. De Weck AL, Sanz ML. Flow cytometric cellular allergen stimulation test (FAST/Flow CAST). Technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy. *ACI International* 2002; 14:204-15.
29. Sudheer PS, Hall JE, Read GF, Rowbottom AW, Williams PE. Flow cytometric investigation of peri-anaesthetic anaphylaxis using CD63 and CD203c. *Anaesthesia* 2005; 60:251-6.
30. Ocmant A, Peignosis Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Shandene L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods* 2007; 30:40-8.
31. Kvedariene V, Kamey S, Ryckwaert Y, Rongier M, Bousquet J, Demoly P, et al. Diagnosis of neuromuscular blocking agent hypersensitivity reactions using cytofluorimetric analysis of basophils. *Allergy* 2006; 61:311-5.
32. Fernández TD, Torres MJ, Blanca-López N, Rodríguez-Bada JL, Gómez E, Cantó G, et al. Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins. *Allergy* 2009;64:242-8.
33. Trabado AR, Hijón CC, Cantariño AR, Carreño SL, Timón SJ, Navarro GP, et al. Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29:241-9.
34. Malbran A, Yeyati E, Rey GL, Galassi N. Diclofenac induces basophil degranulation without increasing CD63 expression in sensitive patients. *Clin Exp Immunol* 2007; 147:99-105.
35. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82:33-40.