

PRÉMIO SPAIC - GLAXOSMITHKLINE 2004 /  
/ SPAIC - GLAXOSMITHKLINE AWARD 2004

# Aplicação do teste de activação dos basófilos no estudo de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos

*Basophil activation test in the study of food and drug hypersensitivity reactions*

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 153-164

Isabel Carrapatoso<sup>1</sup>, Susana Cadinha<sup>2</sup>, María Luiza Sanz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Imunoalergologia, Hospitais da Universidade. Coimbra

<sup>2</sup> Serviço de Imunoalergologia, Hospital de São João. Porto

<sup>3</sup> Departamento de Alergologia e Imunologia Clínica, Clínica Universitária de Navarra. Pamplona.

## RESUMO

O aumento da frequência das reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos constitui um desafio permanente ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Os autores efectuem uma meta-análise da aplicação do teste de activação dos basófilos (TAB) no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos. Os diversos estudos publicados sustentam uma elevada sensibilidade e especificidade do método desde que se observem, na sua execução, determinados requisitos técnicos. Estão descritas correlações positivas e com significado estatístico entre os resultados do TAB e os de outros métodos de diagnóstico de uso corrente, tais como testes cutâneos, doseamentos de IgE específica e prova de provocação oral controlada. A utilização combinada do TAB com outros méto-

dos parece favorecer a eficácia diagnóstica. Actualmente, o conhecimento da aplicabilidade do TAB, assim como das suas vantagens e limitações, é fundamental. Numa abordagem que se pretende economicamente viável, a eficiência no diagnóstico definitivo das reacções de hipersensibilidade será condicionada, seguramente, pela utilização correcta dos diversos métodos disponíveis.

**Palavras chave:** Teste de activação dos basófilos, hipersensibilidade, alimentos, fármacos, testes cutâneos, IgE específica, prova de provocação oral.

## ABSTRACT

*The increase in the prevalence of adverse reactions to foods and drugs represents a constant challenge to the development of new methods of diagnosis. A meta-analysis on published studies concerning the clinical usefulness of the Basophil activation test (BAT) in these reactions was performed. High sensibilities and specificities can be achieved if certain technical requirements are observed. BAT results have a positive and high significant correlations with other routine diagnostic methods such as skin tests, serum specific IgE and oral controlled challenge. Efficacy of diagnosis can be improved with the combined use of BAT and other techniques. In order to achieve a well-conducted evaluation on the diagnosis of hypersensitivity reactions to foods and drugs the best options should be chosen. Concerning BAT, the present knowledge of its usefulness, advantages and limitations is therefore relevant.*

**Key-words:** *Basophil activation test, hypersensitivity, foods, drugs, skin tests, serum specific IgE, oral challenge test.*

## INTRODUÇÃO

**A**s reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos são cada vez mais frequentes, constituindo um problema de saúde pública relevante.

Considerando a actual classificação proposta pelo Comité de nomenclatura da Academia Europeia de

Alergologia e Imunologia Clínica, as reacções devem denominar-se alérgicas, sempre que se demonstre um mecanismo imunológico subjacente, mediado por anticorpos ou por células<sup>1</sup>.

Os mecanismos de estimulação celular iniciam-se, habitualmente, pela activação de receptores de membrana, desencadeando cascatas de eventos intracelulares conducentes à desgranulação, libertação de mediadores

inflamatórios pré-formados, assim como síntese de novo de metabolitos de membrana e citocinas, responsáveis pelas manifestações clínicas de alergia<sup>2</sup>. Nas reacções mediadas pela IgE, a activação do basófilo e do mastócito resulta da ligação do alergénio a duas moléculas de IgE específica adjacentes<sup>2</sup>.

O CD63 é uma glicoproteína de 53 kDa presente nos grânulos citoplasmáticos de diversas células inactivas, em particular dos basófilos<sup>3</sup>. A sua expressão na membrana de basófilos humanos, após activação *in vitro* por alergénios ou anticorpos IgE via receptor de alta afinidade (FcεRI), foi demonstrada por diversos investigadores<sup>4,7</sup>. A desgranulação dos basófilos correlaciona-se fortemente com esta expressão, o que permite considerar o CD63 um marcador ideal para o estudo de activação dos basófilos<sup>8,9</sup>.

No estudo das reacções alérgicas, a recolha de uma anamnese detalhada é fundamental para o diagnóstico correcto, orientando o pedido de exames complementares. Por este motivo, a realização de testes objectivos *in vivo* e/ou *in vitro* é essencial para confirmar a suspeita clínica.

Os métodos disponíveis para o diagnóstico de reacções mediadas pela IgE incluem a realização de testes cutâneos, determinação de IgE específica, testes funcionais *in vitro* e prova de provocação oral controlada<sup>10</sup>.

Os testes cutâneos por picada podem não ser exequíveis, particularmente se existem lesões cutâneas generalizadas, sendo mesmo contra-indicados em situações que envolvam o risco de choque anafiláctico. Também poderão, por vezes, conduzir a resultados falsamente negativos ou positivos<sup>10,11</sup>.

O doseamento de IgE específica, apesar de apresentar, de um modo geral, uma especificidade relativamente elevada no diagnóstico das reacções mediadas pela IgE, tem frequentemente uma sensibilidade inferior à dos testes cutâneos por picada<sup>12</sup>. No entanto, existem situações em que, lamentavelmente, os alergénios necessários à determinação da IgE específica não se encontram disponíveis<sup>13</sup>.

As restrições apontadas anteriormente impõem que, em certos casos, só um teste de provocação permita a demonstração clínica da reactividade. A prova de provocação oral estandardizada e controlada por placebo, apesar de constituir o método mais fidedigno no diagnóstico definitivo das reacções de hipersensibilidade, não é isenta de riscos, sendo a anafilaxia uma contra-indicação absoluta à sua execução. Tratando-se de um método moroso e dispendioso, a sua utilização como método de rotina torna-se, na prática, incomportável.

Os testes para diagnóstico de alergia, baseados na activação *in vitro* dos basófilos sanguíneos em presença do alergénio suspeito, foram descritos na literatura há já muitos anos<sup>2</sup>. Alguns baseiam-se na libertação de mediadores, como a histamina e os sulfidoleucotrienos (CAST – *Cellular Allergen Stimulation Test*), e outros na observação microscópica directa da desgranulação dos basófilos<sup>14,15</sup>.

A identificação do aumento da expressão de marcadores de superfície dos basófilos por citometria de fluxo, após estimulação com alergénios ou fármacos, é um método recente na investigação da alergia<sup>14</sup>. A descoberta do marcador de activação dos basófilos, CD63, foi responsável pelo desenvolvimento do FAST (*Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test*). Esta técnica, também denominada teste de activação dos basófilos (TAB), baseia-se na detecção, por citometria de fluxo, de CD63 em basófilos estimulados, como indicador da activação induzida em presença de alergénios ou fármacos<sup>14</sup>. Em casos particulares, a combinação deste teste com outros, nomeadamente com a libertação de sulfidoleucotrienos pelos basófilos estimulados por alergénios (CAST), demonstrou maior sensibilidade e especificidade relativamente a outros testes *in vitro*, incluindo a determinação de IgE específica<sup>2</sup>.

Sanz *et al* validaram o TAB como método de diagnóstico nas reacções mediadas pela IgE a alergénios inalantes, comparativamente a outros métodos convencionais utilizados por rotina, tais como testes cutâneos, determinação de IgE específica e testes de libertação de

histamina e leucotrienos<sup>3</sup>. Num estudo efectuado em atópicos sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Lolium perenne* estabeleceram-se, como resultado positivo do TAB para os alérgenos inalantes, o ponto de *cut-off* de 15% de basófilos activados, mediante a análise de curvas ROC (*receiver operating characteristic*). A análise destas curvas permite determinar os valores de *cut-off* que conduzem à obtenção de percentagens mais elevadas de sensibilidade e especificidade.

Vários estudos publicados demonstraram a utilidade do TAB na detecção de reacções alérgicas mediadas pela IgE a alérgenos inalantes comuns<sup>3,16,17</sup>, alérgenos alimentares<sup>8,18</sup>, látex<sup>19,20</sup> e veneno de himenópteros<sup>21</sup>. Esta técnica é também importante no diagnóstico de reacções alérgicas a fármacos, como relaxantes musculares<sup>22,23</sup>, beta-lactâmicos<sup>24-26</sup> e metamizol<sup>27</sup>. Num estudo realizado recentemente por Sanz *et al*, o TAB revelou-se como um método com elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)<sup>28,29</sup>.

## DESCRIÇÃO SUMÁRIA DA TÉCNICA

O TAB constitui actualmente uma técnica de fácil execução. Contudo, De Weck *et al* sublinharam a necessidade de observação de determinados pormenores para obtenção de sensibilidades e especificidades óptimas<sup>2</sup>. Assim, a utilização de leucócitos isolados em vez de sangue total, a optimização do processamento das amostras de sangue, o uso de controlos positivos e negativos adequados e a escolha das concentrações de alérgenos e fármacos mais convenientes são premissas essenciais à eficiência da técnica.

### I. Processamento da amostra

O sangue é recolhido em tubos de 7 ml com anti-coagulante ACD (adenina-citrato-dextrose), podendo ser conservado a 4° C, durante 24 horas. Deve solicitar-se um tubo por cada três alérgenos.

### 2. Separação de células

A amostra é submetida a centrifugação a 4° C durante 10 minutos a 1600 rpm. Após retirar o sobrenadante, recolhe-se o halo de células com agulha e seringa, colocando-o num tubo de plástico.

O halo de células é centrifugado a 4° C durante 10 minutos a 1600 rpm. Retira-se de novo o sobrenadante, com agulha e seringa, mantendo aproximadamente um volume de 500µl. A cada tubo adicionam-se 500µl de *Stimulation Buffer* (SB) e 10 µl de heparina, agitando suavemente. O SB contém heparina e interleucina 3.

### 3. Preparação das diluições de alérgenos

#### 3.1 Alimentos e inalantes

As diluições preparam-se a partir de uma concentração dos alérgenos de 10µg/ml.

$$1/8 = 10\mu\text{l (alergénio)} + 70\mu\text{l (SB)} = 80\mu\text{l}$$

$$1/32 = 20\mu\text{l (diluição 1/8)} + 60\mu\text{l (SB)} = 80\mu\text{l}$$

#### 3.2 Fármacos

As diluições dos fármacos preparam-se a partir das formulações utilizadas na clínica, excepto para os antibióticos β-lactâmicos, em que se utilizam as concentrações a seguir indicadas:

Fármaco	Conc. Inicial	Conc. Final
Bencilpenicilina	4 mg/ml	2 mg/ml
	1 mg/ml	0.5mg/ml
Ampicilina	2.4 mg/ml	1.2 mg/ml
	0.6 mg/ml	0.3 mg/ml
Amoxicilina	2.4 mg/ml	1.2 mg/ml
	0.6 mg/ml	0.3mg/ml
MDM	1 mg/ml	0.5 mg/ml
	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml
PPL	50 microg/ml	25 microg/ml
	25 microg/ml	12.5 microg/ml
Cefuroxima	2.4 mg/ml	1.2 mg/ml
	0.6 mg/ml	0.3 mg/ml

Quando se pretendem investigar novos fármacos, é imprescindível testá-los em pelo menos duas concentrações diferentes, preferencialmente em cinco. Deve ainda proceder-se à execução de estudos de viabilidade celular, para excluir concentrações potencialmente citotóxicas. Nos estudos de viabilidade celular indirectos ou funcionais determina-se a percentagem de activação de basófilos em indivíduos atópicos, em presença do alergénio inalante a que se encontram sensibilizados. Posteriormente, procede-se à comparação dos resultados com os que se obtêm utilizando diferentes concentrações do fármaco a testar. A diminuição do número total de células ou de basófilos activados sugere citotoxicidade, permitindo a selecção das concentrações ideais a utilizar no TAB para o fármaco em questão. Os estudos de viabilidade celular directos são aqueles em que se procede à contagem de células vivas, após estimulação com diferentes concentrações do fármaco. Se a percentagem de células vivas for superior a 70%, a concentração testada não é considerada citotóxica.

#### 4. Fase de incubação com o alergénio

Preparam-se os tubos de citometria com 50 µl das diferentes diluições de alergénio. A técnica utiliza sempre dois controlos negativos (SB) e um positivo (SC- *Stimulation control*), que contém anti-IgE para receptores de alta afinidade.

A cada tubo adicionam-se 50 µl de suspensão de células, agitando suavemente. Os tubos são incubados a 37° C durante 40 minutos. Posteriormente adicionam-se 100 µl de solução tampão (HEPES, NaCl, KCl, EDTA, pH 7,3) e centrifugam-se os tubos a 4° C, durante 5 minutos a 2250 rpm.

#### 5. Determinação de células marcadas

Retiram-se 120 µl de sobrenadante e adicionam-se 20 µl de solução monoclonal. Esta solução contém anti-IgE marcada com \*FITC e anti-CD63 marcado com \*PE. Os tubos são incubados na obscuridade a 4° C, durante 30 minutos. Adicionam-se posteriormente 4 ml de solu-

ção de lise, que deverá actuar durante 5 minutos. Bloqueia-se a reacção com 1 ml de solução tampão HEPES. Após centrifugação, durante 5 minutos, a 2250 rpm, decantam-se os tubos e adicionam-se 500 µl de solução tampão HEPES.

Finalmente, após agitação suave de cada tubo, procede-se à leitura dos resultados num citómetro de fluxo (Becton Dickinson™), utilizando o *software* CellQuest.

Em suma, trata-se de uma técnica de diagnóstico *in vitro*, não invasiva, segura, útil, reprodutível e rápida, que pode ser realizada 24 a 48 horas após a colheita sanguínea, permitindo testar qualquer alergénio ou fármaco<sup>2,10</sup>. Sempre que possível, a técnica deverá ser efectuada nas primeiras 24 horas. De Weck *et al* demonstraram que a percentagem de activação dos basófilos decresce a partir das 24 horas, podendo conduzir a resultados falsamente negativos às 48 horas, particularmente quando são testados fármacos<sup>2</sup>.

#### AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

O número absoluto de basófilos e a percentagem de basófilos activados são os parâmetros a considerar na avaliação dos resultados do TAB. Idealmente, o número absoluto de basófilos contabilizados no citómetro deverá aproximar-se de 500, não devendo nunca ser inferior a 150<sup>2</sup>.

No Quadro I indicam-se os critérios de positividade e valores de *cut-off* estabelecidos por Sanz *et al*, com base nos trabalhos dos diversos grupos com reconhecida experiência na aplicação desta técnica<sup>2</sup>. Os *cut-off* são estabelecidos para valores de sensibilidade e especificidade óptimos, mediante a análise de curvas ROC. A necessidade de definição de *cut-off* resulta de uma grande variabilidade nas percentagens de activação, consoante o tipo de alergénio utilizado. Assim, para os alimentos, podem encontrar-se percentagens de activação relativa-

**Quadro I.** Interpretação dos resultados do teste de activação dos basófilos (TAB)

CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE NA INTERPRETAÇÃO DO TAB			
<b>Critério A</b> (percentagem de basófilos activados - %BA)	Inalantes, alimentos e <i>Anisakis</i> : %BA >15%	<b>Critério B</b> (índice de estimulação - SI)	SI > 2 (SI = %BA após estimulação alergénica/ %BA no controlo negativo)
	Látex: %BA > 10%		
	Fármacos: %BA > 5%		
<b>O TAB é considerado positivo sempre que os critérios A e B se verificam simultaneamente</b>			

mente elevadas, para as quais contribuem, muitas vezes, processos de estimulação inespecífica *in vitro*. Por outro lado, no estudo dos fármacos encontram-se, com frequência, percentagens de activação relativamente mais baixas, o que conduz, necessariamente, à utilização de *cut-off* inferiores.

Os indivíduos atópicos, com elevados níveis de IgE, apresentam frequentemente percentagens de activação no controlo positivo superiores às encontradas em controlos saudáveis não atópicos<sup>2</sup>.

### Particularidades

Nos critérios de positividade, é importante considerar, para além da percentagem de activação, o número absoluto de células. Nos casos em que se obtém um número absoluto de células baixo, a utilização de 2 controlos negativos permite seleccionar o que apresenta, contudo, um maior número de células. Nestes casos, dever-se-á valorizar, simultaneamente, a percentagem de activação e o número absoluto de células. O controlo negativo que apresenta uma menor percentagem de activação poderá ser o seleccionado, se apresentar um número absoluto de células consideravelmente superior.

### Controlo negativo positivo

Se o controlo negativo for positivo podemos considerar que esta situação indicia uma anormal estimu-

lação basal (ex: inflamação, infecção, contacto recente com o alergénio) e devemos aconselhar a repetição da análise, posteriormente<sup>2</sup>.

### Controlo positivo negativo

Em algumas situações o controlo positivo (anti-IgE) é negativo, o que poderá, eventualmente, resultar da ausência de receptores para IgE, sendo este fenómeno mais frequente em doentes não atópicos. Valores de activação dos basófilos pelo controlo positivo entre 12% e 30% são considerados baixos, sendo considerados negativos quando inferiores a 12%. Na casuística de De Weck e Sanz a percentagem de doentes em que a anti-IgE para receptores de alta afinidade não provoca activação de basófilos não parece exceder os 4%<sup>2</sup>, embora alguns autores apontem para valores de 5-25%<sup>5,6,8</sup>. Nestes casos, como o resultado do TAB não é valorizável, resultando inconclusivo, não se recomenda a sua repetição.

## APLICAÇÃO DO TAB NO ESTUDO DE REACÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A ALIMENTOS

O aumento da frequência das reacções a alimentos constitui um desafio permanente ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, já que, actualmente, a

evicção do alimento causal continua a ser a medida mais eficaz no controlo desta alergia. Os testes cutâneos, apesar de representarem um exame com elevada reprodutibilidade, têm um valor preditivo positivo inferior a 50%. Os testes cutâneos negativos a alimentos conduzem a uma maior informação na exclusão de alergia alimentar mediada pela IgE, apresentando um valor preditivo negativo superior a 95%<sup>30,31</sup>. O doseamento de IgE específica a alimentos, apesar de apresentar uma especificidade e valor preditivo negativo habitualmente elevados, tem frequentemente uma sensibilidade inferior à dos testes cutâneos por picada<sup>30</sup>.

No estudo da alergia alimentar mediada pela IgE, o exame laboratorial de rotina continua a ser a determinação de IgE específica ao(s) alérgico(s) suspeito(s). Os testes de activação celular não são habitualmente efectuados como exames de rotina, continuando a ser encarados, pela grande maioria dos clínicos, como exames de segunda linha<sup>32</sup>. Contudo, poderão apresentar algumas vantagens, pelo menos no plano teórico, quando comparados com a simples detecção de anticorpos específicos circulantes. Hipoteticamente, ao permitirem o estudo *in vitro* da reactividade celular do doente ao alérgico específico, avaliam não apenas a existência de sensibilidade, mas possibilitam também uma aproximação mais real ao mecanismo fisiopatológico subjacente<sup>8</sup>. Sob um ponto de vista conceptual, poder-se-ão, assim, encarar como estudos dinâmicos *in vitro*.

Na alergia alimentar, a evolução para a tolerância coexiste frequentemente com a manutenção de sensibilização. Os testes cutâneos e a determinação de IgE específica permanecem positivos, na ausência de reactividade clínica. Nestes casos, a realização do TAB poderá fornecer informação adicional sobre uma provável tolerância.

Nos indivíduos com alergia alimentar, observa-se frequentemente uma elevada libertação espontânea de histamina<sup>33-35</sup>. Este facto poderá reduzir a utilidade do teste de libertação de histamina no diagnóstico desta alergia.

Moneret-Vautrin *et al* aplicaram o CAST e o TAB no

diagnóstico de alergia alimentar<sup>8</sup>. Concluíram que a libertação de LTC<sub>4</sub> induzida pelo alérgico e o estudo de activação de basófilos por determinação da expressão do CD63, através de citometria de fluxo, são testes com boa sensibilidade e especificidade. Neste estudo, demonstraram que, em doentes com alergia alimentar, a libertação espontânea de histamina ocorria na ausência de expressão de CD63 e de libertação de LTC<sub>4</sub>. Este achado apoia o conceito de que esta libertação não depende da desgranulação dos basófilos nem reflecte um processo de activação celular. O TAB e o CAST apresentam assim maior utilidade relativamente ao teste de libertação de histamina, no diagnóstico de alergia alimentar, em doentes com elevada libertação espontânea de histamina.

Garcia-Avilés *et al* determinaram por citometria de fluxo a percentagem de basófilos activados expressando o CD63 após estimulação *in vitro* por alérgicos alimentares<sup>18</sup>. Os 74 doentes estudados apresentavam clínica de urticária, asma e/ou rinite alérgica após ingestão alimentar, encontrando-se sensibilizados aos alérgicos alimentares suspeitos (teste cutâneos por picada e doseamento de IgE específica positivos). Nestes doentes efectuaram, ainda, o teste de libertação de histamina e o CAST para os alérgicos estudados. Encontraram uma correlação positiva com significado estatístico entre os resultados do TAB e os dos testes cutâneos, do teste de libertação de histamina, da determinação da IgE específica e do CAST. Neste estudo, o TAB demonstrou uma sensibilidade de 82,3% e uma especificidade de 62,5%, para um *cut-off* de 11%.

De Weck *et al* sublinharam que a utilização de alérgicos alimentares standardizados deverá merecer particular atenção na obtenção de especificidades adequadas<sup>2</sup>. Quando se utilizam alérgicos alimentares no TAB é frequente a obtenção de percentagens de activação muito elevadas para os controlos negativos, comparativamente aos valores obtidos para alérgicos inalantes e fármacos. Provavelmente esta observação resultará do facto de os extractos alimentares se encon-

trarem frequentemente contaminados por compostos, tais como lectinas, com capacidade de activar os basófilos.

Não existem, ainda, estudos publicados que comparem as sensibilidades, especificidades e valores preditivos positivo e negativo do TAB com os da prova de provocação oral, no diagnóstico de alergia alimentar.

Diversos estudos sugerem que concentrações elevadas de IgE específica a alimentos são preditivas de reactividade clínica a esses alimentos. Níveis elevados de IgE específica para determinados alimentos, como o ovo (>6KU/l), o amendoim (>15KU/l), o peixe (>20KU/l) e o leite (>32KU/l), permitiram cálculos de valores preditivos positivos superiores ou iguais a 95%, tornando desnecessário, nestes casos, a realização da prova de provocação oral<sup>32,36</sup>.

Vila L *et al* demonstraram uma elevada sensibilidade do CAST comparativamente aos testes cutâneos por picada, determinação de IgE específica e prova de provocação oral, num grupo de 40 doentes com história de reacção adversa após ingestão alimentar<sup>37</sup>. Estes doentes apresentaram uma libertação de sulfidoleucotrienos após estimulação por alérgénio significativamente superior à dos dois grupos-controlo, constituídos por 20 indivíduos saudáveis e 15 atópicos sensibilizados a aeroalérgénios. Relataram, ainda, que os doentes com história de anafilaxia apresentaram uma libertação de sulfidoleucotrienos superior à dos doentes com manifestações clínicas menos graves.

A realização de estudos multicêntricos e em larga escala, comparando as sensibilidades e especificidades do TAB com a de outros exames utilizados como rotina no diagnóstico de alergia alimentar, é, neste momento, fundamental. A determinação dos valores preditivos positivos para os diferentes alérgénios poderá, nalguns casos, tornar desnecessária a realização da prova de provocação oral. Ao testar a reactividade celular do basófilo em presença do alérgénio específico, poderemos admitir a realização de uma prova de provocação *in vitro*. Será por isso importante correlacionar os resultados do TAB com os da prova de provocação oral e com as

determinações de IgE específica, para a validação do seu uso corrente como método de diagnóstico *in vitro*.

O sucessivo aperfeiçoamento das técnicas laboratoriais aplicadas aos estudos funcionais conduzirá certamente à melhoria da eficácia diagnóstica. No caso particular da alergia alimentar, a melhoria da qualidade dos extractos disponíveis para diagnóstico poderá incluir a utilização de alérgénios recombinantes no TAB<sup>38,39</sup>.

### **APLICAÇÃO DO TAB NO ESTUDO DE REACÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A FÁRMACOS/ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES**

A hipersensibilidade a fármacos permanece uma das áreas mais complexas na prática clínica da imunologia. A heterogeneidade do quadro clínico, da limitação do conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e dos factores predisponentes, escassez e a falta de standardização dos métodos de diagnóstico disponíveis dificultam o seu diagnóstico e, certamente, contribuem para a subvalorização das reacções<sup>40</sup>.

Presentemente, o diagnóstico das reacções de hipersensibilidade a fármacos baseia-se numa história clínica detalhada, testes cutâneos, disponíveis para apenas alguns fármacos, e provas de provocação, indubitavelmente as que apresentam maior sensibilidade, embora acarretem riscos consideráveis<sup>41</sup>.

A utilização do teste de activação dos basófilos como método de diagnóstico no âmbito da alergia a fármacos é muito recente. No que respeita aos fármacos que podem induzir reacções alérgicas mediadas pela IgE, de que são exemplo os beta-lactâmicos<sup>24-26</sup> e o metamizol<sup>27</sup>, vários ensaios clínicos controlados comprovam a utilidade do TAB no esclarecimento do diagnóstico.

As reacções de hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), e em particular ao ácido acetilsalicílico (AAS), manifestam-se por sintomas respiratórios (rinosinusite crónica, polipose nasal e asma)



e/ou cutâneos (urticária e angioedema), que podem ser graves e inclusivamente fatais<sup>42</sup>, representando cerca de 20 a 25% de todas as reacções de hipersensibilidade a fármacos<sup>43</sup>.

Com a provável excepção dos raros casos de choque anafiláctico<sup>42</sup>, é globalmente aceite que as reacções de hipersensibilidade ao AAS e AINEs não dependem da produção de IgE específica, mas assentam em outros mecanismos, em particular na inibição da ciclooxigenase (COX). A inibição da COX-1 resulta na diminuição da produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que regula a produção de sulfidoleucotrienos e a libertação de outros mediadores pelos mastócitos. Os sulfidoleucotrienos, produzidos em maior quantidade pelos doentes com hipersensibilidade ao AAS/AINEs são considerados os principais mediadores neste tipo de reacções<sup>44,45</sup>.

Apesar da incontestável produção de sulfidoleucotrienos por doentes com hipersensibilidade ao AAS/AINEs quando submetidos a provocação com o fármaco suspeito, estudos publicados utilizando a técnica de CAST neste diagnóstico revelam resultados algo contraditórios, alguns apontando para uma baixa sensibilidade, apesar de uma elevada especificidade<sup>41,46</sup>.

Recentemente, o desenvolvimento do TAB e a sua combinação com o CAST reacenderam a polémica envolvendo a aplicação dos testes *in vitro* no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade ao AAS/AINEs, com a apresentação de resultados mais animadores<sup>28,29,42</sup>.

Sainte-Laudy e Vallon investigaram 9 doentes com suspeita de anafilaxia induzida por aspirina e mediada pela IgE, com base na história clínica, testes cutâneos por picada e intradérmicos, determinação de IgE específica e TAB. Verificaram positividade do TAB nos 7 doentes em que foi aplicado e uma forte associação entre este método e uma história clínica sugestiva, testes cutâneos positivos, em particular intradérmicos, e presença de IgE específica. Os diferentes métodos aplicados em controlos saudáveis foram consistentemente negativos<sup>42</sup>.

Gamboa *et al* utilizaram também esta técnica no estudo de 60 doentes com hipersensibilidade ao

AAS/AINEs (38 com sintomas cutâneos, 20 com sintomas respiratórios e 2 com ambos), documentada pela história clínica ou por prova de provocação oral, e 30 controlos (15 asmáticos) com tolerância demonstrada a estes fármacos. Verificaram uma sensibilidade do teste de 43,3%, uma especificidade de 100%, um valor preditivo positivo de 100% e um valor preditivo negativo de 99,4%, após estimulação isolada com duas diferentes concentrações de AAS (1,25 mg/ml; 0,3 mg/ml). Quando utilizados quatro fármacos (AAS, paracetamol, metamizol e diclofenac), a sensibilidade global aumentou para 63,3% e a especificidade decresceu, mantendo-se, no entanto, superior a 90%, pelo que concluíram tratar-se de uma alternativa válida às provas de provocação oral. O naproxeno foi considerado um caso especial porque, quando testado na concentração mais elevada (5 mg/ml), induz a activação de basófilos, não só em doentes com hipersensibilidade a AINEs, também em quase todos os controlos<sup>28</sup>. Esta situação parece relacionar-se com uma potente inibição *in vitro* da PGE<sub>2</sub>, não se tratando, portanto, de uma expressão de citotoxicidade<sup>29</sup>.

Sanz *et al* avaliaram posteriormente, no mesmo grupo de doentes e controlos, a importância de uma utilização conjunta do TAB e do CAST no diagnóstico *in vitro* de reacções de hipersensibilidade ao AAS/AINEs. Ao contrário do que sucede nas reacções alérgicas mediadas pela IgE, em que a correlação entre os dois testes é elevada, a associação do CAST aumentou a sensibilidade em 5-10%, à custa de uma marcada redução da especificidade para valores de cerca de 70%<sup>29</sup>.

De acordo com estes autores, a elevada sensibilidade do TAB faz com que um resultado positivo seja considerado significativo, praticamente confirmando o diagnóstico quando a história clínica é compatível. Para uma maior eficácia, o teste deve ser realizado nos primeiros 6-12 meses após exposição ao fármaco e consequente reacção clínica. Quando, por questões económicas ou outras, não for possível testar os quatro AINEs (AAS, paracetamol, metamizol e diclofenac), os autores sugerem a escolha do AAS e diclofenac nas 2

concentrações inferiores (1,25 mg/ml e 0,3 mg/ml para o AAS; 0,3 mg/ml e 0,06 mg/ml para o diclofenac).

Embora o mecanismo celular subjacente à activação dos basófilos pelos AINEs permaneça desconhecido, estes autores reiteram que não se trata de uma reacção mediada pela IgE. Baseiam esta afirmação em três pressupostos: alguns doentes que praticamente não exprimem receptor de alta afinidade para a IgE continuam a ser estimulados por AINEs; não existe qualquer correlação entre a activação desencadeada pela anti-IgE e a reacção *in vitro* aos AINEs; em contraste com o que sucede nas reacções mediadas pela IgE, não existe uma boa correlação entre a expressão de CD63 e a libertação de sulfidoleucotrienos.

Em suma, Sanz *et al* consideram o TAB um método de diagnóstico *in vitro* reprodutível, com elevada especificidade (>90%) e sensibilidade (60-70%) e que apresenta uma boa correlação com as provas de provocação positivas. Embora resultados negativos no TAB não permitam excluir o diagnóstico, não dispensando a realização de prova de provocação para esclarecimento da situação clínica, resultados positivos associados a uma história compatível praticamente confirmam o diagnóstico. Deste modo, concluem que a utilização do TAB no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade a AINEs pode tratar-se de uma alternativa válida às provas de provocação, muitas vezes incómodas e perigosas, embora seja mandatária a realização de estudos multicêntricos, que já se encontram em curso.

## COMENTÁRIOS

O aumento da frequência das reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos constitui um desafio permanente ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Os diversos métodos actualmente disponíveis obrigam a um conhecimento profundo das suas aplicações, vantagens e limitações. O rigor da metodologia utilizada pelo imunoalergologista na planificação

dos diversos exames a solicitar ao laboratório condiciona a eficiência, sendo essencial ao estabelecimento do diagnóstico definitivo nas reacções de hipersensibilidade.

Ensaio clínico controlado demonstraram que o TAB permite a obtenção de sensibilidades e especificidades elevadas no diagnóstico de reacções alérgicas a alimentos e fármacos, representando uma técnica reprodutível e de fácil execução. O TAB revela-se ainda uma alternativa no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade, particularmente a fármacos, em que não é possível a determinação de IgE específica.

Estão descritas correlações positivas e com significado estatístico entre os resultados do TAB e os de outros métodos de diagnóstico de uso corrente, como testes cutâneos, doseamentos de IgE específica e prova de provocação oral controlada.

Actualmente, encontram-se em curso ensaios multicêntricos e em larga escala que pretendem, sobretudo, a sua comparação com a prova de provocação oral. A possibilidade de recorrer a um método *in vitro*, sem os riscos inerentes a uma exposição *in vivo* ao alérgeno, parece-nos aliciante.

## AGRADECIMENTOS

Com gratidão reconhecemos o elevado apoio técnico e humano de Sonia Ariz, Noelia Cacho e Helena Hermoso, durante a realização do estágio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Johansson SGO, Hourihane JO'B, Bousquet J et al. Position paper: A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813-24.
2. 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.
3. Sanz ML, Sánchez G, Gamboa PM et al. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in

- patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1007-13.
4. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:328-38.
  5. Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergological diagnosis. *Allerg Immunol (Paris)* 1994;26:211-4.
  6. Sabbah A, Sainte-Laudy J. Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *ACI International* 1996;8/4:116-20.
  7. Sainte-Laudy J. Application of flow cytometry to the analysis of activation of human basophils. Immunological validation of the method. *Allerg Immunol (Paris)* 1998;30:41-3.
  8. 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.
  9. Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106: S292-302.
  10. Crockard AD, Ennis M. Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? Editorial. *Clin Exp Allergy* 2001;31:975-77.
  11. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;48:48-82.
  12. Homburger H: *Methodos in Laboratory Immunology*. In: Middleton E, Reed C et al. eds. *Allergy: Principles and Practice I*, 5<sup>a</sup> ed. St Louis: CV Mosby; 1998:417-29.
  13. 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.
  14. Crockard AD, Ennis M. Basophil histamine release tests in the diagnosis of allergy and asthma. Editorial *Clin Exp Allergy* 2001;31:345-50.
  15. Benvenist J. The human basophil degranulation test as an in vitro method for diagnosis of allergies. *Clin Allergy* 1981;11:1-11.
  16. Pâris-Kohler, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:339-45.
  17. Saporta M, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* 2001;56:442-5.
  18. Garcia-Aviles C, Sanchez-Lopez G, Sanz ML et al. Flow-cytometric Cellular Allergen Stimulation Test (FAST) in the in vitro diagnosis of food allergy. *Allergy* 2000;55 (Suppl 63):128.
  19. Ebo DG, Lechkar B, Schuerwegh AJ, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy* 2002;57:706-12.
  20. Sanz ML, Gamboa PM, Garcia-Aviles C et al. Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:33-9.
  21. 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.
  22. Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E et al. Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:411-8.
  23. Monneret G, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenue J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol* 2002;102:192-9.
  24. Sanz ML, DeWeck AL, Uasuf C, Gamboa PM, Chazot M. Use of flow cytometry to assess basophil activation in patients allergic to betalactam antibiotics: correlation between flow-cytometric allergen stimulation test and other in vivo and in vitro tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:307-8.
  25. Sanz ML, Gamboa PM, Uasuf C et al. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002;32:277-86.
  26. Sanz ML, Gamboa PM, de Weck AL. Clinical evaluation of in vitro tests in diagnosis of immediate allergic reactions to  $\beta$ -lactam antibiotics. *ACI International* 2002;14:185-93.
  27. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003;58:312-7.
  28. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1448-57.
  29. Sanz ML, Gamboa P, 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.
  30. Hugh A. Sampson. Improving in-vitro tests for the diagnosis of food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2002;2:257-61.
  31. Hugh A. Sampson. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19.
  32. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Fremont S. Laboratory tests for diagnosis of food allergy: advantages, disadvantages and future perspectives. *Allerg Immunol (Paris)* 2003;35:113-9.

33. Sampson HA, Broadbent KR, Berhise-Broadbent J. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N Engl J Med* 1989;321:228-32.
34. May CD. High spontaneous release of histamine in vitro from leukocytes of persons hypersensitive to food. *J Allergy Clin Immunol* 1976;58:432-37.
35. Boner AL, Folchi Vici E, Carcereri L et al. Spontaneous release of histamine from basophils in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;4:165-69.
36. Hugh A. Sampson, Deborah G Ho. Clinical aspects of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:444-51.
37. Vila L, Sanz ML, Sanchez G, Uasuf CG, Ferrer M, Barrio M, Dieguez I. Study of the in vitro sulphidoleukotriene production in food-allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001; 11:247-54.
38. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy* 1999;29:896-904.
39. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:27-36.
40. Demoly P, Kropf R, Bircher A, Pichler WJ. Drug hypersensitivity questionnaire. *Allergy* 1999;54:999-1003.
41. Lebel B, Messaad D, Kvedariene V, Rongier M, Bousquet J, Demoly P. Cysteinyl-leukotriene release test (CAST) in the diagnosis of immediate drug reactions. *Allergy* 2001;56:688-92.
42. Sainte-Laudy J, Vallon C. Nine cases of suspected IgE-mediated anaphylaxis induced by aspirin. *ACI International* 2002;14:220-2.
43. Faich GA. Adverse drug reaction monitoring. *N Engl J Med* 1986; 314:1589-92.
44. Szczeklik A, Stevenson D. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111;913-21.
45. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:290-6.
46. Pierzchalska M, Mastalerz L, Sanak M, Zazula M, Szczeklik A. A moderate and unspecific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leucocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1785-91.