



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCIANA MABEL FERREIRA VASCONCELOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *IL 10*, *IL 4*, *CTLA4* E *DIAMINO OXIDASE* E HIPERSENSIBILIDADE NÃO ALÉRGICA A ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

FORTALEZA

2017

LUCIANA MABEL FERREIRA VASCONCELOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *IL 10*, *IL 4*, *CTLA4* E *DIAMINO OXIDASE* E HIPERSENSIBILIDADE NÃO ALÉRGICA A ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F1a FERREIRA VASCONCELOS, LUCIANA MABEL.
ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES IL 10, IL 4, CTLA4 E DIAMINO
OXIDASE E HIPERSENSIBILIDADE NÃO ALÉRGICA A ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO
ESTEROIDAIAS / LUCIANA MABEL FERREIRA VASCONCELOS. – 2017.
90 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. APARECIDA TIEMI NAGAO-DIAS.

1. Hipersensibilidade a fármacos. 2. Anti-inflamatórios não esteroidais. 3. Polimorfismo de nucleotídeo
único. I. Título.

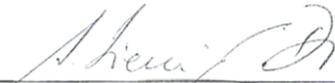
CDD 615

LUCIANA MABEL FERREIRA VASCONCELOS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES DE *IL 10*, *IL 4*, *CTLA-4* E
DIAMINO OXIDASE NA HIPERSENSIBILIDADE NÃO ALÉRGICA A ANTI-
INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS**

Aprovada em: 27 / 06 / 2017

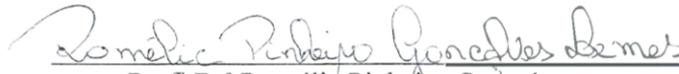
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Aparecida Tiemi Nagao-Dias (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Drª Maria do Socorro Queiroz Alves de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Drª Romélia Pinheiro Gonçalves de Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Drª Juliana Navarro Ueda Yaochite
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Drª Fabrícia Martins Teixeira
Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Senhor da minha vida, por estar vivendo esse momento e alcançando essa conquista. Tenho convicção de que Ele me sustentou e me fortaleceu em todos os momentos da minha caminhada, principalmente nos momentos de dificuldades. Hoje eu posso dizer que nesses cinco anos de doutorado eu venci um dia de cada vez. Glórias seja a ELE.

Agradeço ao meu amado esposo Felipe Felix por ser minha base, meu consolo, meu sorriso, meu abraço para comemorar, meu ombro para chorar. Obrigada, meu querido, por acreditar em mim, e me fazer acreditar que eu seria capaz. Eu jamais teria conseguido sem você.

Agradeço aos meus pais, Raimundo Nonato e Raimunda Ferreira por uma vida de dedicação. Sei que essa conquista é de grande orgulho para vocês e eu estou feliz em proporcionar isso. Não tenho palavras para dizer o quanto eu os amo.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Aparecida Tiemi Nagao-Dias por ter me acolhido no laboratório de Imunologia, o qual foi pra mim, durante nove anos minha segunda casa e segunda família. Seu exemplo e influência sobre a minha vida ultrapassaram os limites profissionais. Generosidade, paciência, seriedade, responsabilidade, amor, compaixão, solidariedade e doação são algumas atitudes que me vem à mente quando lembro dela. Obrigada, professora, por ser incrivelmente única, por todos os ensinamentos, por me confiar por inúmeras vezes suas turmas de graduação e me dar a oportunidade de desenvolver a docência, e crescer em todos os aspectos. Obrigada por toda a ajuda, incentivo e apoio que a senhora sempre me deu quando eu precisei. Mais uma vez obrigada.

Agradeço à prof^a Dr^a Zirlane Castelo Branco Coêlho por todo carinho, compartilhamento, incentivo, e principalmente pelo exemplo de força e superação.

Agradeço em especial ao doutorando Raphael Rodrigues de Oliveira. Raphael, você me ajudou de todas as formas possíveis nesse trabalho. Muito obrigada, principalmente pelo grande apoio e paciência em me ajudar inúmeras vezes com o procedimento experimental (risos) diariamente no laboratório e também com a análise estatística do trabalho e sua complexa interpretação.

Agradeço à colega doutoranda Eudiana Vale Francelino pela parceria na realização desse trabalho. Por muitas vezes, passamos por dificuldades para avançar no trabalho, mas sua persistência e força de vontade me encorajaram a não desistir. Sou muito grata por isso.

Agradeço às medicas Dr^ª. Thereza Lúcia Prata de Almeida e Dr^ª. Janaira Fernandes Severo Ferreira pela grandiosa colaboração nesse trabalho. Obrigada por tornar esse trabalho possível através da disponibilidade de vocês para analisar os casos clínicos. Sem a vossa ajuda, esse trabalho não teria sido possível.

Agradeço a incomensurável ajuda das bolsistas de Iniciação científica, Andressa Almeida Albuquerque e Gabriele Danthéias Barroso. Vocês me ajudaram muito, não somente com o trabalho experimental, mas também com o apoio e incentivo. Muito obrigada.

Agradeço aos colegas que fazem parte do laboratório de Imunologia (LABIM) e também aqueles que passaram. Todos são muito especiais para mim. Sou grata por todo o tempo que passamos juntos, nos ajudando mutuamente e crescendo como pesquisadores. Agradeço em especial a doutoranda Luri Sasahara, pela grande ajuda com a parte experimental. Agradeço aos colegas Alexandre Casimiro, Milena Braga, Evandro Cunha, Paulo Germano, Thially Braga, Camila Pontes. Levarei boas lembranças de vocês.

Aproveito para agradecer toda a equipe de bolsistas do Centro de Farmacovigilância do Ceará (CEFACE): Angelina Bastos, Elana Figueiredo, Gabriela Abreu, Sarah Resende, Andressa Albuquerque e Natália Matias, pela grande ajuda na captação de pacientes para o estudo, além do grande apoio na recepção dos pacientes durante as avaliações clínicas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na pessoa da Prof^ª Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal por todo o apoio, confiança, disponibilidade e incentivo nesses cinco anos de curso. Agradeço ao secretário do programa Maxwilliam Rodrigues pela disponibilidade e alegria em ajudar.

Agradeço em especial ao Dr. José Wilson Aciolly Filho, chefe do Departamento de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio pela confiança que sempre demonstrou no nosso grupo de pesquisa e por abrir as portas do ambulatório para que

pudéssemos captar os pacientes com o perfil do estudo. Agradeço também a todos os funcionários do ambulatório, pela disponibilidade e ajuda sempre quando necessário.

Agradeço a Dr^a. Luciana Carlos, diretora geral do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), pela permissão dada a nossa equipe de pesquisa para abordar os doadores de sangue. Agradeço também a toda equipe do HEMOCE envolvida na recepção e doação pela ajuda nesse trabalho. Agradeço também aos doadores que participaram como voluntários para o estudo.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Barem Rabenhorst e a toda equipe do laboratório de genética molecular (LABGEM) do Departamento de Biomedicina da UFC pela valiosa contribuição na padronização das técnicas de biologia molecular e também por ceder o laboratório para que pudéssemos ter um tempo de um proveitoso aprendizado.

Agradeço em especial a todos os funcionários do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), em especial à secretária Adagisa Torquato Silva. Agradeço a profa Dra. Renata Sousa Alves, a época chefe do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas Prof. Dr. Eurico Litton Pinheiro de Freitas (LACT), por disponibilizar o laboratório inúmeras vezes para o processamento das amostras. Agradeço em especial ao Glautemberg Almeida e Gerluce Vidal pela grande ajuda na coleta de sangue dos pacientes.

Agradeço às professoras Dr^a. Maria do Socorro Queiroz Alves de Souza e Dr^a. Maria Fernanda Malaman pelas valiosas contribuições durante o processo de qualificação desse trabalho. Agradeço a disponibilidade, a paciência e a gentileza. Aproveito para agradecer aos membros da banca, Prof^a Dr^a Juliana Navarro Ueda Yaochite, Profa. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves, Profa Dra. Fabricia Martins Teixeira e também aos professores Dr. José Wilson Aciolly Filho e Dr^a. Zirlane Castelo Branco Coêlho pela, disponibilidade e cortesia em aceitarem a participação como suplentes.

Agradeço a todos os pacientes que confiaram no grupo de pesquisa e possibilitaram a concretização desse trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por subsidiar financeiramente a realização desse estudo.

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos (Marcel Proust).

RESUMO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são responsáveis por 20 a 25% das reações adversas a medicamentos. Em indivíduos susceptíveis, podem ocorrer doença respiratória exacerbada por AINES, doença cutânea exacerbada por AINES, angioedema/urticária induzidos por AINES, angioedema/urticária ou anafilaxia induzido por único AINE. Os mecanismos dessas reações não são totalmente conhecidos, mas há fortes evidências de que um deles seja a inibição da cicloxigenase-1, o que pode levar a uma produção exacerbada de leucotrienos. É possível que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes associados à resposta inflamatória promovam uma maior suscetibilidade a hipersensibilidade a AINES. O conhecimento da influência de fatores genéticos na modificação da resposta do indivíduo aos fármacos e a personalização da terapia tem se tornado um desafio promissor no campo da farmacogenética. O objetivo do presente estudo foi avaliar polimorfismos genéticos em moléculas envolvidas em hipersensibilidade não alérgica a AINES. Polimorfismo nos genes *IL4* (-589 C/T, rs 2243250), *IL10* (-1082 G/A, rs1800896), *DIAMINO OXIDASE* (+8956 C/G, rs 1049793) e *CTLA4* (+49 A/G, rs 231775) foram investigados. Utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase- polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), amostras de DNA extraídas de sangue periférico de pacientes e controles foram analisadas. O estudo foi aprovado em 10 de março de 2014 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, número 550.608. Quanto ao polimorfismo de IL 10 -1082 G/A a maior frequência de carreadores do genótipo AG (57,4%) ($p=0,018$) e carreadores do alelo G foi encontrada entre os pacientes (70,4%) ($p=0,010$) em relação aos controles (38,9% e 48,4%, respectivamente). Verificou-se que o alelo G estava significativamente associado à hipersensibilidade a AINES ($p=0,025$). Para o polimorfismo de CTLA-4 +49 A/G, as frequências de carreadores do genótipo AG (30,9%) ($p=0,012$) e do alelo A (52,7%) ($p=0,033$) foram significativamente menores no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle (52,1% versus 71,3%). Uma associação significativa também foi encontrada entre os genótipos IL-10 -1082AG e IL-4 -589CC em pacientes com hipersensibilidade a AINES ($p=0,031$), indicando que indivíduos que carregavam simultaneamente esses dois genótipos apresentavam cerca de 3,5 vezes a probabilidade de desenvolverem hipersensibilidade não alérgica a AINES. Esses achados sugerem que indivíduos com níveis de produção intermediários de IL-10, menor expressão de CTLA-4 e baixos níveis de IL-4 são mais propensos a apresentar hipersensibilidade não alérgica a AINES. Esse é o primeiro estudo brasileiro a realizar a associação entre polimorfismos em genes de citocinas, nos genes *CTLA 4* e *DAO* em uma população clinicamente bem caracterizada de pacientes com hipersensibilidade cruzada a AINES. A perspectiva de que, em um futuro próximo, essas reações sejam evitadas na população foi o principal motivo que impulsionou a realização desse trabalho. Para que isso seja realidade, faz-se necessário um aprofundamento no estudo da influência dos fatores genéticos e ambientais na modificação da resposta do indivíduo a esses fármacos.

Palavras-chave: Hipersensibilidade a fármacos. Anti-inflamatórios não esteroidais. Polimorfismo de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are responsible for 20 to 25% of the adverse drug reactions. In susceptible individuals, it can occur NSAIDs- exacerbated respiratory disease, NSAIDs- exacerbated cutaneous disease, NSAIDs- induced angioedema/urticaria and angioedema/ hives or anaphylaxis induced to a single NSAID. The mechanisms of these reactions are not totally known, but there is high evidence that one of them is related to the inhibition of cyclooxygenase-1, what can lead to an overproduction of leukotrienes. It is possible that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes associated with the inflammatory response promote a greater susceptibility to NSAIDs hypersensitivity. The influence of genetic factors in modifying the individual's response to drugs, including NSAIDs, has become a promising challenge in the field of pharmacogenetics. The objective of the present study was to evaluate genetic polymorphisms of molecules involved in cross-sensitivity to NSAIDs. Interleukin-4 (-589 C/T, rs2243250), interleukin-10 (-1082 G/A, rs1800896), diamino oxidase (+8956C/G, rs 1049793), CTLA-4 (+49A/G rs 231775) polymorphisms were investigated. Using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique, DNA samples extracted from peripheral blood of patients and controls were analyzed. On 14 March 2014, the study was approved by the Research Ethics Comitee at Hospital Universitário Walter Cantídio, number 550.608. Regarding the IL10 -1082 polymorphism, higher frequencies of the AG genotype (57.4%) ($p = 0.018$) and G allele carriers were found among the patients (70.4%) ($p = 0.010$) than among controls (38.9% and 48.4%, respectively). The G allele was found to be significantly associated with NSAIDS hypersensitivity ($p = 0.025$). For CTLA4 +49 A/G SNP, AG genotype (30.9%) ($p = 0.012$) and A carrier (52.7%) ($p = 0.033$) frequencies were found to be significantly lower in the patient group when compared with the control group (52.1% versus 71.3%). A significant association was also found between IL10-1082AG and IL4-589CC in NSAIDS hypersensitivity patients ($p = 0.031$), which indicated that individuals bearing those genotypes concurrently presented about 3.5 times probability of having NSAID crossreactive hypersensitivity. These findings suggest that individuals who have intermediate IL-10 levels, lower CTLA-4 expression, and low IL-4 levels are more prone to present with cross reactive hypersensitivity. This is the first Brazilian study to carry out the association between polymorphisms in cytokine, CTLA-4 and DAO genes in a clinically well-characterized population of patients with NSAID cross-hypersensitivity. The prospect that, in the near future, these reactions are avoided in the population was the main motive that drove the realization of this work. For this to be a reality, it is necessary to deepen the study of the influence of genetic and environmental factors on the modification of the individual's response to these drugs.

Keywords: Drug hypersensitivity. Nonsteroidal anti-inflammatory Drugs. Single nucleotide polymorphism.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Indicações para os testes de puntura e intradérmico.....	24
QUADRO 2. Classificação dos AINES em grupos químicos.....	27
QUADRO 3. Classificação dos AINES quanto à seletividade na inibição das ciclooxigenases.....	28
QUADRO 4. Critérios para o diagnóstico de reação de hipersensibilidade a AINES.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Algoritmo para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade a AINES.....	44
FIGURA 2. Angioedema induzido por AINES.....	52
FIGURA 3. Amplificação do fragmento de 476 pb do gene DAO em gel de agarose.....	53
FIGURA 4. Produto da restrição do fragmento gênico da DAO em poliacrilamida.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação de Gell e Coombs para hipersensibilidade a fármacos.....	21
TABELA 2. Classificação das reações de hipersensibilidade induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (EAACI, ENDA, 2013).....	29
TABELA 3. Iniciadores utilizados na amplificação de fragmentos gênicos de IL-10 (-1082 G/A), IL-4 (-589 C/T), CTLA-4 (+49A/G) e DAO (+8956 C/G).....	46
TABELA 4. Condições para a realização da reação em cadeia da polimerase.....	46
TABELA 5. Posição do polimorfismo, amplicons, endonucleases de restrição e fragmentos de digestão.....	49
TABELA 6. Diagnóstico dos pacientes com hipersensibilidade a AINES de acordo com a classificação EAACI/ENDA (2013).....	51
TABELA 7. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (-1082 G/A) do gene <i>IL 10</i> em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle.....	54
TABELA 8. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (+49 A/G) do gene <i>CTLA 4</i> em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle.....	55
TABELA 9. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (+8956 C/G) do gene <i>DAO</i> em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle.....	56
TABELA 10. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (-589 C/T) do gene <i>IL 4</i> em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle.....	57
TABELA 11. Combinação dos genótipos dos genes <i>IL10</i> (-1082) e <i>IL4</i> (-589) em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES (n=54) e grupo controle (n=95)...	58
TABELA 12. Combinação dos alelos dos genes <i>IL10</i> (-1082) e <i>IL4</i> (-589) em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES (n=54) e grupo controle (n=95).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
CisLT	Cisteinil-leucotrieno
C/EPB β	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CTLA-4	<i>Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen 4</i> - Antígeno 4- Associado ao Linfócito T Citotóxico
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DAO	Diamino oxidase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
DRESS	<i>Drug Reaction with Eosinifilia and Sistemic Symptons</i> - Reação à droga com eosinofilia e sintomas sistêmicos
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i> - Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENDA	<i>European Network for Drug Allergy</i> - Rede Européia de alergia a fármacos
Fc ϵ RI	Receptor de alta afinidade para IgE
GA ₂ LEN	<i>The Global Allergy and Asthma European Network</i> - Rede européia de excelência global de alergia e asma
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> - Antígeno leucocitário humano
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IC	Intervalo de confiança
IgE	Imunoglobulina E
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4

IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i> - Interferon-gama
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
LT4S	Leucotrieno 4 sintase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NECD	<i>NSAIDS-exacerbated cutaneous disease</i> - Doença cutânea exacerbada por AINES
NERD	<i>NSAIDS-exacerbated respiratory disease</i> - Doença respiratória exacerbada por AINES
NET	Necrólise epidérmica tóxica
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> - Fator nuclear de células T ativadas
NIUA	<i>NSAIDS - induced urticaria/angioedema</i>
NSAIDS	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> - razão de chances
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PEGA	Pustulose exantemática aguda generalizada
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
RAM	Reações adversas a medicamentos
RAST	<i>Radioallergosorbent test</i> - Teste radioalergosorvente
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Restrição do Polimorfismo no Fragmento de Restrição
RHM	Reações de hipersensibilidade a medicamentos
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto

SSJ	<i>Stevens-Johnson Syndrome</i> - Síndrome de Stevens-Johnson
STA	Serviço de testes alérgicos
SUS	Sistema único de saúde
PB	Pares de bases
SNIDR	<i>Single-NSAID-induced delayed reactions</i> - Reações tardias induzidas por um único AINE
SNIUAA	<i>Single-NSAID-induced urticaria/angioedema or anaphylaxis</i> Urticária/angioedema ou anafilaxia induzidos por um único AINE
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
TCR	<i>T cell receptor</i> - Receptor de células T
TH1	<i>Type 1 helper</i> - Auxiliar tipo 1
TH2	<i>Type 2 helper</i> - Auxiliar tipo 2
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Reações de hipersensibilidade a medicamentos	20
1.2 Mecanismos imunopatogênicos	21
1.3 Diagnóstico das reações de hipersensibilidade	23
<i>1.3.1 Diagnóstico clínico</i>	23
<i>1.3.2 Testes cutâneos</i>	23
<i>1.3.2.1 Testes de puntura e intradérmico de leitura imediata</i>	24
<i>1.3.2.2 Testes epicutâneos</i>	24
<i>1.3.3 Teste de provocação</i>	25
1.4 Fármacos implicados nas reações de hipersensibilidade	26
1.5 Anti-inflamatórios não esteroidais	26
<i>1.5.1 Mecanismos patogênicos das reações de hipersensibilidade a AINES</i>	31
<i>1.5.2 Genes candidatos na pesquisa de polimorfismos funcionais associados à predisposição no desenvolvimento de hipersensibilidade a AINES</i>	33
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Delineamento do estudo	40
4.2 Casuística	40
<i>4.2.1 Entrevista</i>	41
<i>4.2.1.1 Critérios de inclusão e exclusão de casos</i>	41
<i>4.2.1.2 Critérios de inclusão e exclusão de controles</i>	41
<i>4.2.2 Avaliação clínica com alergologista</i>	42
<i>4.2.3 Genotipagem</i>	45
<i>4.2.3.1 Amplificação do material genético e análise das frequências de polimorfismos em genes alvos</i>	45
<i>4.2.3.2 Análise do polimorfismo (-1082 G/A) no gene IL 10</i>	47

4.2.3.3 <i>Análise do polimorfismo (-589 C/T) no gene IL 4</i>	48
4.2.3.4 <i>Análise do polimorfismo (+49 A/G) no gene CTLA-4</i>	48
4.2.3.5 <i>Análise do polimorfismo (+8956C/G) no gene DAO</i>	49
4.3 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	71
8 REFERÊNCIAS	72
9 APÊNDICES	81
10 ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reações de hipersensibilidade a medicamentos

As reações de hipersensibilidade a medicamentos (RHM) pertencem ao Grupo B das reações adversas a medicamentos e se caracterizam por serem imprevisíveis, dose-independentes, nocivas e não intencionais, ocorrendo quando um fármaco é administrado em doses usuais em seres humanos (DEMOLY *et al.*, 2014).

Estima-se que as RHM afetem cerca de 7% da população mundial, respondam por cerca de 3 a 6% das admissões hospitalares, e acometam 10 a 15% dos pacientes hospitalizados, prologando o tempo de internação. São consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um sério problema de saúde pública. As manifestações cutâneas de hipersensibilidade mais frequentes são as erupções urticarianas e maculopapulosas (THONG; TAN, 2011; DEMOLY *et al.*, 2014).

A classificação das RHM constitui um desafio, pois o mecanismo subjacente nem sempre é compreendido. Clinicamente, as RHM podem ser classificadas em imediatas e não imediatas, diferindo quanto ao intervalo de tempo entre a administração do fármaco e o aparecimento das reações (BIRCHER; HOLFMEIER, 2012).

As reações imediatas são induzidas por mecanismos dependentes e independentes de imunoglobulina E (IgE) e mastócitos, e surgem até aproximadamente seis horas após a última administração do fármaco (BIRCHER; HOLFMEIER, 2012). As manifestações clínicas mais comuns são prurido e urticária, com ou sem angioedema e anafilaxia. A anafilaxia é uma reação alérgica grave que envolve vários órgãos. Os sintomas iniciais típicos são prurido palmar ou plantar, urticária e angioedema. O paciente pode apresentar náuseas, dor abdominal, vômito e diarreia (SCHNYDER, 2010).

As reações tardias surgem aproximadamente 12 horas após a última administração do fármaco, sendo as principais manifestações clínicas erupções maculopapulosas e exantemas urticarianos. Essas erupções cutâneas podem aparecer alguns dias após a administração do fármaco e geralmente estão associadas a mecanismos de reação alérgica dependentes de células T, mas também de imunoglobulinas G, M e/ou A (DEMOLY *et al.*, 2014).

1.2 Mecanismos imunopatogênicos

Fármacos, em sua maioria, são pequenos compostos de baixo peso molecular (<1.000 Daltons) que não são imunogênicos, ou seja, não são capazes de estimular o sistema imune. Para que isso aconteça faz-se necessária sua conjugação a moléculas carreadoras (proteínas autólogas). Como exemplo, estão os antibióticos beta-lactâmicos. Outros fármacos, conhecidos como pró-haptenos, necessitam de prévia metabolização antes da conjugação. (PICHLER; 2002a). Existem ainda aqueles que são quimicamente inertes. No entanto, devido à sua estrutura, possuem maior afinidade por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) ou a receptores de linfócitos T (TCR) e ligam-se induzindo a ativação (PICHLER *et al.*, 2002b). As RHM são classificadas em quatro tipos segundo Gell e Coombs (Tabela 1).

TABELA 1. Classificação de Gell e Coombs para hipersensibilidade a fármacos

Tipo	Tipo de resposta imune	Fisiopatologia	Sintomas clínicos	Cronologia típica
I	IgE	Degranulação de mastócitos e basófilos	Choque anafilático Urticária Angiodema Broncoespasmo	1 a 6 horas após a última administração do fármaco
II	IgG e complemento	Citotoxicidade dependente de IgG e complemento	Citopenia	5-15 dias após o início do uso do fármaco
III	IgG ou IgM e complemento ou FcR	Deposição de complexos imunes	Doença do soro Urticária Vasculite	7-8 dias para doença do soro/urticária 7-21 dias após início do uso do fármaco para vasculites
IVa	Th1 (IFN- γ)	Inflamação monocítica	Eczema	1-21 dias após início do uso do fármaco
IVb	Th2 (IL-4 e IL-5)	Inflamação eosinofílica	Exantema maculopapuloso DRESS	1 a vários dias, 2 a 6 semanas

Tipo	Tipo de resposta imune	Fisiopatologia	Sintomas clínicos	Cronologia típica
IVc	Células T citotóxicas (perforinas, granzimas, FasL)	Morte de queratinócitos mediada por CD4 ou CD8	Exantema maculopapuloso, SSJ, NET, exantema pustuloso	1 a 2 dias após início do uso do fármaco para erupção fixa 4-28 dias após o início do uso do fármaco para SSJ e NET
IVd	Células T (IL8, CXCL8)	Inflamação neutrofílica	Pustulose exantemática aguda generalizada	Tipicamente 1-2 dias após o início do fármaco, mas pode ser mais tempo

Siglas: SSJ: Síndrome de Stevens-Johnson, NET: Necrólise epidérmica tóxica
Adaptado de: DEMOLY *et al.* (2014)

As reações do tipo I ou imediatas geralmente decorrem da ligação de anticorpos do isotipo IgE a receptores de alta afinidade em mastócitos e basófilos. Em indivíduos previamente sensibilizados, os antígenos ligam-se a duas moléculas de IgE, induzindo a liberação de mediadores pré-formados (histamina, triptase, fator de necrose tumoral alfa ou TNF- α) e a produção de mediadores neoformados (leucotrienos, prostaglandinas, cininas, citocinas), os quais são responsáveis pelas manifestações clínicas (DEMOLY *et al.*, 2014).

Geralmente, o paciente desenvolve urticária e angioedema logo na primeira hora após a exposição ao fármaco. Os sintomas podem evoluir com prurido nas regiões palmar, plantar, genital, eritema na região torácica e em aproximadamente 20 minutos cursarem com urticária generalizada. Edema laríngeo, broncoespasmo, e angioedema periorbitário e perioral também estão presentes em reações mais graves (PICHLER *et al.*, 2010).

Reações imediatas não alérgicas decorrem da ativação inespecífica e posterior desgranulação de mastócitos e basófilos. Outras causas são acúmulo de bradicinina, ativação do complemento e alteração da via do ácido araquidônico (AA). As manifestações clínicas são similares, mas como são independentes de IgE, não possuem os mecanismos imunológicos de memória, e ocorrem em indivíduos não sensibilizados (ROMANO *et al.*, 2011; DEMOLY *et al.*, 2014).

As RHM tardias são mediadas por linfócitos T e comumente surgem após várias horas ou até dias de tratamento. Essas reações afetam principalmente a pele e se manifestam como exantema maculopapuloso, erupção fixa a fármacos, síndrome de Stevens-Johnson (SSJ), necrólise epidérmica tóxica (NET), pustulose exantemática aguda generalizada (PEGA),

síndrome de hipersensibilidade sistêmica a fármacos (SHF/DRESS). É possível que haja alterações sistêmicas incluindo anemia, neutropenia e trombocitopenia e ainda acometimento dos órgãos internos, resultando em hepatite e falência renal (DEMOLY *et al.*, 2014).

1.3 Diagnóstico das reações de hipersensibilidade

O diagnóstico das reações imediatas e tardias é feito através da história clínica do paciente, dos testes cutâneos, e quando disponíveis, através de testes laboratoriais *in vitro* e testes de provocação. Na investigação das reações imediatas, é comum a determinação da IgE total por ensaio imunoenzimático (ELISA) e da IgE específica através do teste radioalergosorvente (*radioallergosorbent test*- RAST) (DAHER *et al.*, 2009).

1.3.1 Diagnóstico clínico

Uma história clínica detalhada é absolutamente necessária. A mesma deve conter informações sobre o fármaco suspeito, dose, intervalo de tempo entre a administração do fármaco e a reação, via de administração, tipo de manifestações e comorbidades (ABERER; KRANKE, 2009). Recomenda-se a elaboração de um diagrama da linha do tempo em casos em que vários fármacos tenham sido administrados (BROCKOW *et al.*, 2015). Uma busca na literatura sobre os fármacos potencialmente responsáveis pela reação pode ser de grande valia. Documentações fotográficas também podem ser úteis, principalmente nos casos em que o paciente seja avaliado após a fase sintomática (MIRAKIAN *et al.*, 2009)..

1.3.2 Testes cutâneos

Os testes cutâneos têm sido considerados poderosas ferramentas no diagnóstico das reações de hipersensibilidade a medicamentos, principalmente porque dão indícios do mecanismo imunológico envolvidos.

Guias específicos de padronização desses testes foram publicados pelas seguintes redes de pesquisa internacionais: Rede Européia de alergia a fármacos (*European Network Drug on Drug Allergy-ENDA*), Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica (*European Academy of Allergology and Clinical Immunology-EAACI*) (BROCKOW *et al.*, 2013) e Rede européia de excelência global de alergia e asma (*The Global Allergy and Asthma European Network -GA2LEN*) (HEINZERLING *et al.*, 2013).

Vários trabalhos trazem concentrações não irritativas dos fármacos e os veículos apropriados para a aplicação dos mesmos. Geralmente, as irritações são causadas pela natureza das substâncias ou misturas aplicadas na pele e também por concentrações elevadas do alérgeno (LACHAPELLE; MAIBACH, 2003; BARBAUD, 2009; BROCKOW *et al.*, 2002; BROCKOW *et al.*, 2013).

1.3.2.1 Testes de puntura e intradérmico de leitura imediata

Quando os sinais e sintomas do paciente sugerem reações mediadas por IgE, ocorrendo na primeira hora após a administração do (s) fármaco (s), recomenda-se a realização do teste de puntura e, quando este apresenta resultado negativo, recomenda-se o teste intradérmico de leitura imediata. A lista completa de indicações para os testes de puntura e teste intradérmico podem ser visualizados no quadro 1.

QUADRO 1. Indicações para os testes de puntura e intradérmico

Manifestações clínicas
Erupção eritematosa/ <i>flushing</i> (rubor)
Urticária
Angioedema
Anafilaxia
Conjuntivite
Rinite
Broncoespasmo/ asma

Fonte: KRANKE, ABERER (2009).

1.3.2.2 Testes epicutâneos

O teste de contato, epicutâneo ou *patch test* é utilizado atualmente no diagnóstico das reações de hipersensibilidade tardia a fármacos. As principais indicações vão desde reações moderadas (eczemas generalizados, exantemas maculopulosos ou dermatite de contato) até reações graves (SSJ/NET) (BARBAUD, 2009).

O teste epicutâneo é realizado através da aplicação do alérgeno sobre o dorso do paciente por 2 dias utilizando Finn Chambers® ou um adesivo hipoalergênico. O principal

objetivo é reproduzir uma reação eczematosa através da aplicação do fármaco sob oclusão na pele intacta de pacientes supostamente alérgicos. Assim, consiste na visualização *in vivo* de uma reação tardia do tipo IV de Gell e Combs. A interpretação geralmente é realizada de acordo com o *International Contact Dermatitis Research Group* (LACHAPELLE; MAIBACH, 2003).

Recomenda-se uma leitura aos 20 minutos, após 48h e após 96h. Leituras posteriores podem ser necessárias. Alguns autores recomendam uma leitura adicional 7 dias após a aplicação do teste (BARBAUD, 2009). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a necessidade de leitura de 7 dias para a realização da leitura do teste epicutâneo para rifamicina (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

O valor preditivo negativo dos testes cutâneos geralmente é baixo porque são os metabólitos do fármaco (e não o próprio fármaco) os responsáveis pela reação (BROCKOW *et al.*, 2002). Portanto, um teste negativo não exclui alergia enquanto um resultado positivo significa que o paciente está sensibilizado.

Em muitos casos, a potência, a estabilidade dos reagentes e as concentrações dos fármacos não têm sido suficientemente validados (KRANKE; ABERER, 2009).

1.3.3 Teste de provocação

O teste de provocação consiste na administração controlada de um fármaco para diagnosticar reações de hipersensibilidade a fármacos alérgicas e não alérgicas. Assim, pode reproduzir fenômenos mediados ou não imunologicamente. A principal vantagem é que esse teste leva em conta o metabolismo do indivíduo e suas características genéticas individuais (ABERER, KRANKE, 2009). É considerado o teste padrão-ouro para confirmar imputabilidade de um fármaco em relação às reações de hipersensibilidade, mas deve ser reservado para situações específicas. Por exemplo, quando um fármaco importante para o tratamento do paciente é suspeito de ter provocado uma intolerância e/ou quando outros métodos de diagnóstico não foram conclusivos (CHIRIAC; DEMOLY, 2013; DEMOLY *et al.*, 2014).

O teste de provocação está indicado em duas principais situações: (1) para excluir hipersensibilidade a um fármaco suspeito em casos em que a história não é convincente e em pacientes com sintomas inespecíficos, como por exemplo, sintoma vagal após anestesia local; (2) para estabelecer o diagnóstico em histórias clínicas sugestivas em que os demais testes disponíveis foram negativos, inconclusivos ou estavam indisponíveis (BOUSQUET *et al.*, 2008; ABERER; KRANKE, 2009).

Esse teste deve ser realizado em pacientes em condições estáveis de saúde e em local com o suporte médico de emergência necessário para antecipar qualquer reação adversa (ABERER; KRANKE, 2009).

O teste de provocação não é indicado na gravidez ou em pacientes que apresentam co-morbidades relacionadas a infecções agudas, asma descontrolada, doenças cardíacas, renais, hepáticas ou quaisquer doenças que tragam instabilidade para a condição clínica do paciente durante a realização do teste. Também não está indicado em casos de reações graves (SSJ, NET, DRESS). Alguns autores consideram que sua aplicação deve ser minuciosamente analisada, quanto ao risco-benefício para o paciente (ABERER *et al.*, 2003; MIRAKIAN *et al.*, 2009; CHIRIAC; DEMOLY, 2013). Um consenso definido por especialistas concluiu que os testes cutâneos são os testes mais seguros para determinar sensibilização à fármacos, e que os testes de provocação podem ser potencialmente perigosos (BROCKOW *et al.*, 2013).

1.4 Fármacos implicados nas reações de hipersensibilidade

Os fármacos mais implicados nas reações de hipersensibilidade são os antibióticos betalactâmicos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e em menor proporção, quinolonas, meios de contrastes e relaxantes musculares (CANTO *et al.*, 2009). A prevalência na população geral está estimada em 0,6 a 5,7%, sendo os mesmos responsáveis por 21 a 25% de todos os casos de reações adversas a medicamentos (KOWALSKI *et al.*, 2013).

1.5 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os AINES são fármacos largamente utilizados para o alívio da dor e tratamento da inflamação (SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2004; CANTO *et al.*, 2009). O desenvolvimento e a produção desses fármacos tiveram início em 1897, quando o ácido acetilsalicílico (AAS) foi sintetizado pelo químico Felix Hoffman da Companhia Bayer, EUA, a partir do ácido salicílico e ácido acético. Dois anos depois, a molécula foi comercializada pela mesma empresa com o nome de Aspirina® (GROSSER *et al.*, 2012). Os AINES são atualmente classificados em diferentes grupos químicos (Quadro 2).

QUADRO 2. Classificação dos AINES em grupos químicos

Classificação química dos AINES	
Grupo	Fármacos
Derivados do ácido salicílico	Ácido acetilsalicílico, Salsalate, Sulfassalazina, Diflunisal, Trisalicilato de magnésio colina
Derivado do para-aminofenol	Paracetamol
Ácidos indolacéticos	Indometacina, Etodolaco, Sulindaco
Ácidos heteroaril-acético	Diclofenaco, Cetorolaco, Tolmetin
Ácidos propiônicos	Ibuprofeno, Naproxeno, Naproxeno sódico Benoxaprofeno, Fenoprofeno, Cetoprofeno
Fenamatos	Ácido mefenâmico, ácido meclofenâmico
Ácidos enólicos	Oxicams (piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam), pirazonas (dipirona, Fenilbutazona, Oxifenilbutazona)
Coxibes de primeira geração	Rofecoxibe, Celecoxibe
Coxibes de segunda geração	Etoricoxibe, Valdecoxibe Lumiracoxibe, Parecoxibe

Adaptado de: VARALDA; MOTA (2009) e SÁNCHEZ-BORGES (2010)

Em 1971, foi demonstrado que o mecanismo do AAS e de outros AINES está relacionado à inibição de duas isoenzimas: COX-1 (constitutiva) ou COX-2 (induzida), responsáveis pela formação de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (AA) (BRUNE; HINZ, 2004). Assim, os AINES também são classificados quanto à seletividade em relação à inibição das isoenzimas das ciclooxigenases (Quadro 3):

QUADRO 3. Classificação dos AINES quanto à seletividade na inibição das ciclooxigenases

Classificação dos AINES	
Seletividade	Fármacos
Inibidores fracos da COX-1	Paracetamol, salsalate, meloxicam, nimesulida
Fortes inibidores da COX-1	Ácido acetilsalicílico, dipirona, fenilbutazona, oxifenilbutazona, piroxicam, diflunisal, diclofenaco, indometacina, etodolaco, sulindaco, tolmetin, ácido mefenâmico, meclofenamato, ibuprofeno, naproxeno, naproxenosódico, cetoprofeno, fenoprofeno, ketorolac
Inibidores seletivos da COX-2	Rofecoxibe, celecoxibe, etoricoxibe, valdecoxibe, lumiracoxibe, parecoxibe

FONTE: Adaptado de Canto *et al.* (2009)

No Brasil e em outros países, fármacos como o ácido acetilsalicílico, paracetamol e ibuprofeno estão presentes em medicamentos *over the counter*, ou seja, aqueles vendidos sem prescrição médica. Segundo alguns autores, o fácil acesso a esses medicamentos e o seu uso irracional explicam o largo espectro de reações adversas associados aos uso desses medicamentos (ASERO, 2007; SÁNCHEZ-BORGES, 2010; CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012).

As reações adversas aos AINES afetam 0,5% a 1,9% da população geral e correspondem a 20-25% de todas as Reações Adversas a Medicamentos (RAM) (KOWASKI *et al.*, 2011). As reações adversas a medicamentos são definidas pela Organização Mundial de Saúde como respostas medicamentosas prejudiciais, não intencionais, as quais ocorrem após a administração de fármacos em doses normalmente utilizadas na população para profilaxia, diagnóstico e tratamento de uma doença ou para modificação de um sistema fisiológico (KHAN, SOLENSKY, 2010).

As RAM são classificadas em reações do tipo A e do tipo B. As reações do tipo A representam 80% das reações adversas, são previsíveis, dependentes da dose e podem ocorrer em qualquer indivíduo. As reações do tipo B são imprevisíveis, não dependem da dose e estão relacionadas à resposta imunológica e à susceptibilidade genética do indivíduo (SÁNCHEZ, BORGES; 2010).

As principais reações adversas relacionadas ao uso dos AINES são aquelas do tipo A. Entre os efeitos colaterais relacionados estão a intolerância gastrointestinal devido à redução da presença da prostaglandina E2, protetora da mucosa gástrica. O uso de AINES também pode desencadear insuficiência renal crônica induzida por fármacos devido à vasoconstrição da arteríola aferente e diminuição da taxa de filtração glomerular (ENSINA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-BORGES, 2010; CAIMMI *et al.*, 2012; KOWASKI; MAKOWSKA, 2015).

Dentre as reações do tipo B estão as reações de hipersensibilidade. Em sua maioria, essas reações possuem mecanismos não imunológicos e estão relacionadas com a inibição da COX-1, induzindo uma exarcebação da vias dos leucotrienos. No caso de alergia a um único AINE, o mecanismo envolvido é imunológico (mediado por IgE ou linfócitos T) (KOWASLKI *et al.*, 2013).

A classificação atual das reações de hipersensibilidade a AINES foi originalmente proposta por Stevenson *et al.* (2001) e modificada pelo *European Network for Drug Allergy* (ENDA) e pela *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) (Kowalski *et al.*, 2013).

As reações de hipersensibilidade a AINES são classificadas em: Doença respiratória exacerbada por AINES; Doença cutânea exacerbada por AINES; Urticária/Angiodema induzidos por AINES; Urticária/angioedema ou anafilaxia induzidos por único AINE e Reações de hipersensibilidade tardia induzida por AINES.

TABELA 2. Classificação das reações de hipersensibilidade induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (EAACI, ENDA, 2013)

Tipo de reação	Manifestação clínica	Tempo	Doença de base	Reação	Mecanismo implicado
Doença respiratória exacerbada por AINES	Obstrução brônquica, dispneia e/ou congestão nasal/rinorréia		Asma/ rinossinusite		Inibição da COX-1
Doença cutânea exacerbada por AINES	Urticária e/ou angioedema	Imediato	Urticária crônica	Reação cruzada	Inibição da COX-1
Urticária/angioedema induzido por AINES	Urticária e/ou angioedema		Sem doenças crônicas de base		Provável inibição da COX-1

Tipo de reação	Manifestação clínica	Tempo	Doença de base	Reação	Mecanismo implicado
Angiodema/ urticária ou anafilaxia induzido por um único AINE	Urticária/ Angioedema ou anafilaxia	Imediato	Sem doenças crônicas de base	Sem reação cruzada	Mediada por IgE
Hipersensibilidade tardia induzida por um AINE	Vários sintomas e órgãos envolvidos (erupção fixa por fármacos, SSJ, NET, nefrite)	Tardia	Não há doenças crônicas de base	Sem reação cruzada	Mediada por células T

Fonte: Adaptado de KOWALSKI *et al.* (2013) e ORTEGA *et al.* (2014)

As reações de hipersensibilidade a AINES manifestam-se em uma variedade de sintomas: respiratórios (asma brônquica, rinosinusite, dispneia, congestão nasal); lesões cutâneas (urticária, angioedema, *rashes*); quadros mistos de sintomas respiratórios e/ou cutâneos e sintomas sistêmicos semelhantes à anafilaxia (SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2009). Os AINES podem causar episódios agudos de urticária e/ou angioedema ou agravar uma urticária ou asma crônica pré-existente (GRATTAN, 2003).

Reações desencadeadas por um único AINE ou a um conjunto de fármacos do mesmo grupo decorrem de mecanismos mediados por IgE, e os pacientes são classificados como respondedores seletivos. Aqueles que experimentam reações não específicas são classificados hipersensibilidade não alérgica a AINES ou reatividade cruzada, pois as respostas são desencadeadas por AINES de diferentes grupos químicos (CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012; KOWALSKI *et al.*, 2013).

A doença respiratória exacerbada por AINES (*NSAIDs exacerbated respiratory disease - NERD*), anteriormente conhecida como *Aspirin exacerbated respiratory disease - AERD* geralmente ocorre após a administração de AINES de diferentes grupos químicos e por isso, acredita-se que o mecanismo envolvido seja a exacerbção da produção de leucotrienos (KOWALSKI *et al.*, 2013). Manifesta-se por rinosinusite crônica, pólipos nasais e/ou asma persistente como doença de base. Os pacientes apresentam um rubor (*flushing*) na face torácica superior, rinite, conjuntivite, obstrução nasal e/ou, exacerbção da asma (SÁNCHEZ-BORGES, 2010).

Cerca de 20 a 30% de pacientes com urticária crônica (persistente por mais de 6

meses) apresentam agravamento do quadro de urticária após administração de Aspirina®. Essa exacerbação é denominada doença cutânea exacerbada por AINES (*NSAIDs exacerbated cutaneous disease – NECD*) e também ocorre após a administração de AINES de diferentes classes químicas (GRATTAN, 2002; SZCZEKLIK *et al.*, 2007).

As reações de urticária e/ou angioedema induzidos por AINES ocorrem após a administração de diferentes AINES em indivíduos sem doenças respiratórias de base (DOÑA *et al.*, 2010; HIZAWA, 2012). Lesões urticarianas são decorrentes da vasodilatação e consequente edema na derme superficial e erupções eritematopapulosas, cutâneas de formas e tamanhos variados. O angioedema é resultado do comprometimento vascular na derme profunda e do tecido subcutâneo do paciente (MEDEIROS, 2005). Embora os mecanismos para o aparecimento da vasodilatação não estejam totalmente esclarecidos, o desvio para a via das lipoxigenases e uma maior produção de leucotrienos é o principal mecanismo proposto nesses casos (KOWALSKI *et al.*, 2011).

Quanto ao quadro de urticária/angioedema ou anafilaxia induzidos por único AINE, os principais fármacos implicados são as Pirazolonas. Através dos testes cutâneos é possível constatar a sensibilização dos pacientes a esses fármacos (DOÑA *et al.*, 2010; CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012).

As reações de hipersensibilidade tardias a AINES são mediadas por linfócitos T e se manifestam em alguns dias ou semanas após a administração do fármaco. As principais reações observadas são erupção cutânea por fármacos e reações maculopapulosas, embora manifestações órgão-específicas raras (meningite asséptica, pneumonia ou nefrite) também tenham sido reportadas (PHAM *et al.*, 2016).

1.5.1 Mecanismos patogênicos das reações de hipersensibilidade a AINES

Vários estudos têm buscado desvendar os mecanismos patogênicos responsáveis pelas reações de hipersensibilidade a AINES (KAWAGISHI *et al.*, 2002; TORRES-GALVAN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010). Está bem estabelecido que, em indivíduos susceptíveis, a exposição a AINES forte inibidores da COX-1, resulta em produção exagerada de leucotrienos e/ou deficiência de prostaglandina E2 (KIM *et al.*, 2010).

No entanto, pacientes com reatividade cruzada toleram bem AINES com fraca atividade sobre a COX-1 e inibidores seletivos da COX-2, como mostra o estudo de BAVBEK *et al.* (2004). O paracetamol, um fraco inibidor da COX-1, é considerado uma alternativa terapêutica segura para a maioria dos pacientes com hipersensibilidade a AINES quando

administrado em doses diárias que não excedam 500-1000 mg (SZCZEKLIK *et al.*, 2007).

O bloqueio da COX-1 promove o desvio do metabolismo para a via da enzima 5-lipoxigenase e conseqüente produção exacerbada de cisteinil-leucotrienos-CisLT [leucotrieno C4 (LTC4), leucotrieno D4 (LTD4) e leucotrieno E4 (LTE4)], e conseqüentemente, os sintomas envolvidos nas reações de hipersensibilidade a AINES, como broncoespasmo, rinite, urticária e angioedema (ASERO, 2001; SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2009).

Após um desafio com Aspirina®, os níveis basais de leucotrienos cisteínicos, principalmente LTE4, elevam-se significativamente na urina de pacientes com urticária induzida por AINES. Fato semelhante ocorre na NERD e na NECD (MASTARLEZ *et al.*, 2004; MASTARLEZ *et al.*, 2005).

O uso de AINES também inibe a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (MASTARLEZ *et al.*, 2005). A PGE2 é um prostanóide que regula a produção de leucotrienos cisteínicos e prostaglandina D2 (PGD2) de mastócitos ativados (CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2009). Uma diminuição da produção de PGE2 pode promover a exarcebação da produção dos leucotrienos cisteínicos, levando à broncoconstrição (SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2009).

Além dos mecanismos não imunológicos citados, observou-se que o uso de anti-histamínicos melhora o quadro sintomático das reações desencadeadas por AINES, e por isso, alguns autores sugerem uma participação importante de mastócitos nessas reações (KOWASKI *et al.*, 2011; AGÚNDEZ *et al.*, 2012).

Considerando que provavelmente os mecanismos das reações de hipersensibilidade a AINES sejam multifatoriais e possivelmente multigênicos, há um crescente interesse na avaliação de polimorfismos em regiões regulatórias ou codificadoras de genes específicos (KIM *et al.*, 2010).

Os polimorfismos genéticos são variações em seqüências nucleotídicas que ocorrem de forma estável, com frequência de 1% ou superior na população geral e podem ser associados com a resposta terapêutica. É conhecido que tais polimorfismos favorecem o aparecimento de doenças (SYVANEN, 2001; METZGER *et al.*, 2006).

A pesquisa sobre a genética das reações de hipersensibilidade a AINES aumentou sobremaneira nos últimos anos, particularmente para doenças respiratórias exacerbadas por AINES e para casos de urticária crônica exacerbada por Aspirina® (CHOI *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; TORRES- GALVAN *et al.*, 2009). No entanto, poucos estudos exploram urticária/ angioedema induzidos por AINES (CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012).

1.5.2 Genes candidatos na pesquisa de polimorfismos funcionais associados à predisposição no desenvolvimento de hipersensibilidade a AINES

Polimorfismos genéticos que aumentam ou desregulam a expressão de genes envolvidos na produção dos leucotrienos cisteínicos são considerados fatores de risco para hipersensibilidade induzida por vários AINES (KIM *et al.*, 2006). Nesse sentido, o polimorfismo da enzima Leucotrieno 4 sintase (LTC4S) -444 A/C constitui um gene candidato como marcador das reações de hipersensibilidade a AINES (CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012).

A LTC4S é uma proteína integral de membrana que conjuga LTA4 com glutathiona (GSH) para formar LTC4, sendo a enzima terminal responsável pela produção dos leucotrienos cisteínicos (LAM, AUSTEN; 2002; RINALDO-MATTHIS; HAEGGSTROM, 2010).

A regulação transcricional do gene da enzima LTC4S pode ser influenciada pela presença de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) na sua região promotora. Acredita-se que uma única base polimórfica pode causar a desregulação na atividade ou produção de uma determinada proteína. Dessa forma, quanto à LTC4S, a substituição de uma adenina por uma citosina na posição -444 do gene que codifica a enzima está relacionada com predisposição à hipersensibilidade por AINES em algumas populações. O alelo polimórfico C está relacionado com uma maior capacidade produtora da enzima, o que resulta em uma superprodução de leucotrienos cisteínicos (SANAK *et al.*, 1997; SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2009).

A contribuição genética desse polimorfismo é corroborada pelo aumento da expressão de mRNA da enzima LTC4S em eosinófilos, mucosa brônquica, mastócitos brônquicos e mucosa nasal de pacientes com NERD (KIM *et al.*, 2010). O polimorfismo no gene *LTC4S* (-444 A/C) também está associado com urticária e angioedema induzido por AINES. MASTARLERZ *et al.* (2004) demonstraram que a superprodução de leucotrienos está associada com polimorfismo na região promotora de LTC4S (-444 A/C) em 74 pacientes poloneses com urticaria induzida por AINES, sendo que o alelo polimórfico C estava associado com uma maior atividade da LTC4S.

De modo semelhante, Sánchez- Borges *et al.* (2009) também verificaram a associação do polimorfismo (-444 A/C) no gene *LTC4S* e urticária induzida por AINES em 110 pacientes venezuelanos.

Estudos realizados por García-Martin *et al.* (2007) e Kennedy *et al.* (2008) indicam uma associação entre polimorfismos em genes de enzimas metabolizadoras de histamina e reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES.

Após sua secreção por mastócitos e basófilos, a histamina é metabolizada por duas enzimas: a enzima histamina N-metil transferase e a enzima diamino oxidase (DAO). A histamina N-metil transferase catalisa a metilação do anel da histamina para formar a N-metil histamina, a qual é convertida em N-metilimidazolacético pela monoaminoxidase. Alternativamente, a histamina pode sofrer deaminação oxidativa catalisada pela enzima DAO formando ácido imidazolacético, que é então convertido em ribosídeo do ácido imidazolacético. Esses metabólitos são excretados através da urina (GROSSER *et al.*, 2012).

Agúndez *et al* (2012) observaram uma associação entre polimorfismo em genes que codificam a enzima DAO, envolvida no metabolismo da histamina, e hipersensibilidade a AINES. Segundo os autores, frequência aumentada da variante polimórfica resultou em uma menor capacidade de metabolização da histamina em indivíduos com hipersensibilidade a AINES. Eles verificaram que a substituição de histidina por ácido aspártico na posição 645 (His645Asp) sozinha ou combinada com a substituição de treonina por metionina na posição 31 (Thr31Met) estavam mais frequentes em pacientes com hipersensibilidade a AINES do que em controles.

Um estudo realizado na Espanha por Ayuso *et al* (2007) constatou que o polimorfismo do gene *DAO* na posição +8956, com consequente substituição His645Asp foi responsável pela diminuição da atividade da enzima.

Um estudo recente realizado por OUSSALAH *et al* (2016) evidenciou o papel dos mecanismos imunológicos nas reações de hipersensibilidade não alérgicas a AINES, principalmente das citocinas pro-inflamatórias e das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade. Alguns autores (QUIRALTE *et al.*, 1999) encontraram uma maior frequência de alelos HLA-DR11 nos casos de hipersensibilidade a AINES em comparação aos controles.

Kurosawa *et al.* (2016) demonstraram que a frequência de genótipos TT/CT no gene *IL13* na posição -1111 foi maior do que a do genótipo CC na asma exarcebada a AINES, comparativamente ao grupo tolerante a aspirina e controles. A interleucina 13 é uma citocina secretada por linfócitos Th2, e possui ação semelhante ao de IL-4, ou seja, de induzir a produção de IgE por linfócitos B. Dessa forma, ela retém um papel importante em processos alérgicos.

A interleucina 4 (IL-4) é considerada uma citocina com papel central no desenvolvimento de asma alérgica e atopia. Polimorfismos do gene dessa citocina alteram sua transcrição e tradução e influenciam a patogênese de doenças alérgicas (KAMALI-SARVESTANI *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2010).

A expressão de IL-4 pode ser alterada pelos polimorfismos (-33C/T e -589C/T)

através da modulação da afinidade da ligação de fatores de transcrição, como as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EPB β) e o fator nuclear de células T ativadas (NFAT). O alelo polimórfico T do polimorfismo -589 C/T está associado com um aumento da produção de IL-4 e conseqüentemente com o aparecimento de reações de hipersensibilidade a AINES em indivíduos susceptíveis (KIM *et al.*, 2010).

O gene *IL 4* está localizado no cromossomo 5 e possui cerca de 19 polimorfismos conhecidos. A substituição de uma citocina por uma timina na posição -589 está associada com asma e com níveis elevados de IgE (KAMALI-SARVESTANI *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2010). Um estudo realizado por KIM *et al.* (2010), verificou que o polimorfismo -589C/T estava associado a hipersensibilidade aos AINES em asmáticos.

Polimorfismos em genes que codificam citocinas e que possuem ação regulatória sobre o sistema imune, tais como IL-10 estão sendo estudados em reações alérgicas a fármacos. No entanto, são escassos dados na literatura que relacionem essa citocina e hipersensibilidade não alérgica a AINES.

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina importante na imunorregulação e no controle da inflamação, pois atua inibindo a produção de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ e IL-2) e do perfil Th2 (IL-4 e IL-5) (GUGLIELM *et al.*, 2006). Trata-se de uma citocina chave do perfil T regulador produzida por linfócitos T e B. Na presença de IL-10, os linfócitos T não proliferam e não produzem citocinas em resposta ao alérgeno, tornando-se irresponsivos (QIAO *et al.*, 2007).

O gene *IL 10* contém cinco éxons e localiza-se no braço longo do cromossomo 1, entre 1q31 e 1q32, ocupando aproximadamente 5,1 kb. Na região promotora proximal do gene da IL-10 são encontrados três SNPs localizados nas posições -1082 (A/G), -819 (T/C) e -592 (C/A) (QIAO *et al.*, 2007). O nível de produção desta citocina é determinada principalmente pela taxa de síntese de RNAm, que por sua vez depende destes polimorfismos em seu promotor (LINSINGEN, 2008). Os haplótipos GCC, ACC e ATA estão associados com alta, intermediária e baixa produção de IL-10, respectivamente (EDWARDS-SMITH, 1999).

Em relação à posição -1082 da região promotora do gene *IL-10*, estudos anteriores mostraram que indivíduos em homozigose para o alelo G demonstraram uma elevada produção dessa citocina. Indivíduos em heterozigose para o mesmo alelo apresentam produção intermediária de IL-10, e aqueles em homozigose para o alelo A, estariam produzindo baixas quantidades da citocina. Essa correlação é independente dos polimorfismos nas posições -819 e -592 (TURNER *et al.*, 1997).

Rodrigues *et al.* (2014) demonstraram que pacientes HIV positivos alérgicos a

efavirenz apresentaram uma frequência maior do genótipo IL-10 -1082AA em comparação com pacientes não alérgicos ($p = 0,019$). Do mesmo modo, o alelo IL-10 -1082A foi identificado significativamente mais frequentemente entre os doentes com alergia ao efavirenz do que no grupo não alérgico ($p = 0,009$).

A molécula CTLA-4, acrônimo do inglês *Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen 4* (Antígeno 4 do linfócito T citotóxico), é um membro da superfamília das imunoglobulinas expressa em células T ativadas. Ela também possui um papel chave na inibição da ativação das células T (MUNTHER-KAAS *et al.*, 2004). CTLA-4 liga-se à molécula B7 presente na superfície das células apresentadoras de antígenos, resultando em sinais negativos para a célula T, o que afeta a ativação, proliferação clonal, produção de citocinas e a resposta imune (MILICIC *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001).

Dada a importância de CTLA-4 sobre a ativação das células T, investigações quanto a associação entre o polimorfismo na posição +49 A/G e doenças auto-imunes foi realizada em estudos anteriores. Esse polimorfismo está localizado no éxon 1 do gene *CTLA4* e promove a substituição do aminoácido treonina pela alanina (Thr-Ala) no códon 17 do peptídeo CTLA-4, promovendo a diminuição da expressão dessa molécula sobre a superfície dos linfócitos T. (MILICIC *et al.*, 2000; PAVKOVIC *et al.*, 2003; UEDA *et al.*, 2003). A regulação condicionada pelo genótipo da expressão de CTLA-4 sobre a superfície celular pode ser explicada pela presença de uma variação funcional na sequência de aminoácidos da molécula, localizada no motivo Y201 da cauda citoplasmática. Esse motivo é um importante regulador transcricional dos níveis intracelulares de CTLA-4 através de suas interações com os complexos adaptadores da clatrina (AP-2 e AP-1), os quais medeiam, respectivamente, a degradação e a endocitose de CTLA-4 (LIGERS *et al.*, 2001).

O alelo +49G está relacionado a uma menor expressão de moléculas CTLA-4 sobre a superfície das células T, o que interfere na inibição da ativação celular. Considerando que as células T estão envolvidas em diversas respostas imunológicas, seja através da produção de citocinas ou como células efetoras (QIAO *et al.*, 2005), supõe-se que tal polimorfismo funcional pode ser um fator importante na patogênese das doenças auto-imunes, como por exemplo, Doença de Graves, Tireoidite de Hashimoto, Esclerose múltipla e Lúpus eritematoso sistêmico (PAVKOVIC *et al.*, 2003).

A associação entre o polimorfismo +49 A/G e atopia também está reportada na literatura. Um estudo realizado em Taiwan por Yang *et al.* (2004) revelou que o genótipo GG e uma menor expressão de CTLA-4 estão relacionados a uma menor produção de IgE total e a menores índices de doenças atópicas, asma e rinite entre mulheres.

O papel da molécula CTLA-4 nos complexos mecanismos de hipersensibilidade a fármacos ainda é pouco explorada. Investigando o polimorfismo do gene *CTLA4* + 49A/G, Rodrigues *et al.* (2017) observaram que não houve associação significativa nas frequências de alelos e genótipos entre pacientes HIV positivos alérgicos a efavirenz e controles não alérgicos. Entretanto, os autores encontraram uma correlação inversa significativa entre os polimorfismos CTLA-4 + 49A/G e IL-4-589 C/T (OR = -0,6501, $p = 0,001$), indicando que a menor capacidade de inibição da atividade de linfócitos T está inversamente correlacionado com o genótipo IL-4-589TT, o que induz uma elevada produção de IL-4.

2. JUSTIFICATIVA

A busca das bases genéticas para a elucidação dos fatores desencadeantes das reações de hipersensibilidade a medicamentos constitui um desafio promissor da farmacogenética em todo o mundo. A farmacogenética é o estudo de como diferenças genéticas afetam variações da resposta aos medicamentos (LIMDI; VEENSTRA, 2010).

No Brasil, há poucos trabalhos que relacionem polimorfismos e hipersensibilidade a medicamentos. No Estado de São Paulo, um estudo realizado por Tanno et al. (2015) analisou a associação de polimorfismos no genes das enzimas do citocromo P450 envolvidas no metabolismo de fármacos antiepilépticos e reações de hipersensibilidade graves.

Nosso grupo descreveu recentemente a associação entre os polimorfismos genéticos IL-10 -592 C/A, IL-4 -589 C/T, IFN- γ +874 A/T, CTLA-4 +49 A/G em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os quais apresentaram reações de hipersensibilidade ao antirretroviral Efavirenz (RODRIGUES *et al.*, 2017). Verificou-se que a presença combinada dos alelos IL-10 -1082A (GA + AA) e IL-4 -589T (CT + TT) nos pacientes aumentou em 16 vezes o risco de reação ao efavirenz.

A partir dessas investigações, decidiu-se polimorfismos genéticos de alvos relacionados a inflamação, regulação imune e metabolismo da histamina em hipersensibilidade a AINES, considerando que não há estudos semelhantes no Brasil e pouco se sabe sobre os fatores genéticos envolvidos na etiologia dessas reações. Assim, estudou-se a associação entre a frequência dos polimorfismos dos genes *IL10* (-1082 G/A), *IL 4* (-589C/T), *CTLA 4* (+49 A/G) e *DAO* (+8956 C/G) e hipersensibilidade não alérgica a AINES.

A perspectiva de que, em um futuro próximo, reações de hipersensibilidade a AINES sejam evitadas na população é o principais motivo que impulsiona a realização desse trabalho. Para que isso seja possível, é necessário um melhor conhecimento da influência de fatores genéticos na modificação da resposta do individuo a esses fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre os polimorfismos nos genes das citocinas IL-10, IL-4, da molécula regulatória CTLA-4 e da enzima diamino oxidase em pacientes com hipersensibilidade não alérgica aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) em um hospital universitário.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil dos pacientes com diagnóstico presumido ou confirmado de reações de hipersensibilidade decorrentes da utilização de anti-inflamatórios não esteroidais;
- Analisar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos -1082 G/A de IL-10, -589 C/T de IL-4, + 49 A/G da molécula regulatória CTLA-4 e + 8956 C/G da enzima diamino oxidase em pacientes com hipersensibilidade associada ao uso de AINES e em controles;
- Identificar possível correlação entre os genótipos nos grupos de pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e controles.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo do tipo caso-controle. De acordo com Bonita *et al.* (2010), esse tipo de estudo baseia-se na comparação entre dois grupos de indivíduos: os casos (pessoas com a doença ou outra variável de desfecho) e os controles, grupo de referência (pessoas sem a doença ou outra variável de desfecho).

4.2 Casuística

Durante a seleção dos participantes do estudo, foram considerados “casos” somente aqueles pacientes com reação de hipersensibilidade não alérgica a AINES, ou seja, aqueles que apresentaram reação de hipersensibilidade (urticária e/ou angioedema) a pelo menos dois grupos químicos de AINES.

A avaliação clínica foi realizada através de uma alergologista colaboradora do projeto. As consultas foram realizadas no Ambulatório de Dermatologia, Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC). A seleção dos pacientes ocorreu no período compreendido entre Fevereiro de 2014 e Agosto de 2015. O estudo foi aprovado em 10 de março de 2014 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC em Fortaleza, Ceará, Brasil, sob o parecer substanciado número 550.608 (anexo A).

O HUWC/UFC é um hospital de referência na formação de recursos humanos e desenvolvimento de pesquisas na área da saúde, desempenha importante papel na assistência à saúde do Estado do Ceará, estando integrado ao Sistema Único de Saúde - SUS (UFC, 2015). O HUWC participa da Rede Brasileira de Hospitais Sentinela, composta por hospitais de ensino e/ou alta complexidade para atuarem como observatórios ativos do desempenho e segurança de produtos para a saúde e de notificações de reações adversas a medicamentos (ANVISA, 2015).

Desde 2005, foi estabelecida uma estreita cooperação entre o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), da Faculdade de Farmácia (UFC) e médicos do ambulatório de Dermatologia do HUWC/UFC, no que tange pacientes com suspeita diagnóstica de RAM. A partir dessa colaboração, surgiram diversos projetos, entre eles, a implantação do Serviço de Testes Alérgicos a Medicamentos (STA). O STA realizou a busca ativa de RAM e os direcionou para consulta com a alergologista.

Desta forma, para a seleção de casos e controles nesse estudo realizou-se entrevista e avaliação clínica.

4.2.1 Entrevista

Foi desenvolvido um método de busca ativa de reações de hipersensibilidade a medicamentos no ambulatório de dermatologia do HUWC/UFC com a participação dos próprios pesquisadores e de alunos do curso de Farmácia. Pacientes e acompanhantes foram abordados com a seguinte pergunta: “o (a) senhor (a) tem já teve algum tipo de reação após o uso de medicamentos?”. Nos casos em que resposta foi positiva, foi aplicado um questionário modificado de Demoly *et al.* (1999) como instrumento para investigação de história anterior ou atual de hipersensibilidade não alérgica a AINES (APÊNDICE A).

4.2.1.1 Critérios de inclusão e exclusão de casos

Foram incluídos inicialmente no estudo indivíduos que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B), brasileiros, naturais do Estado do Ceará, maiores de idade e que apresentavam história clínica anterior ou atual sugestiva de hipersensibilidade não alérgica a AINES. A amostragem foi formada por conveniência, totalizando ao final 54 pacientes.

Foram excluídos pacientes gestantes, indivíduos em uso de beta-bloqueadores, corticoids, imunossupressores e inibidores da enzima conversora de angiotensina; pacientes com alguma contra-indicação para uso de epinefrina, portadores de infecções graves e ainda aqueles com doenças cardíacas de base (DOÑA *et al.*, 2010; CAIMMI *et al.*, 2012). Para a fase de genotipagem, a presença de urticária crônica ou doença respiratória exacerbada por AINES como doenças de base também foi utilizado como critério de exclusão (CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012).

4.2.1.2 Critérios de inclusão e exclusão de controles

Os indivíduos controles foram selecionados no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), mediante prévia autorização da diretoria da referida instituição. Os doadores foram abordados momentos antes da doação de sangue e informados sobre os detalhes da pesquisa. Aqueles que aceitaram participar, responderam a um questionário

adaptado de Demoly *et al.* (1999), com o objetivo de investigar a existência de história anterior de hipersensibilidade a AINES (APÊNDICE C). Doadores que relataram ausência de história prévia de hipersensibilidade a quaisquer AINES, foram convidados a participar do estudo e assinar o TCLE (APÊNDICE D). Os participantes deveriam também ser procedentes do Estado do Ceará. Os mesmos foram selecionados de acordo com a idade e sexo dos casos. Posteriormente, foi coletado um volume de 4 ml de sangue com anti-coagulante EDTA e incluídos apenas voluntários saudáveis e que apresentaram resultados negativos na sorologia para doenças infecciosas totalizando 95 indivíduos.

4.2.2 Avaliação clínica com alergologista

O diagnóstico de hipersensibilidade a AINES foi realizado de acordo com a literatura especializada que estabelece como parâmetro central a história clínica do paciente, exame físico e quando possível, testes *in vivo* (KOWALSKI; MAKOWSKA, 2015).

Foram consultadas as diretrizes publicadas pela EAACI/ENDA para classificação e diagnóstico das reações de hipersensibilidade a AINES (KOWASLKI *et al.*, 2011; KOWASLKI *et al.*, 2013).

As seguintes informações foram resgatadas através da história clínica: fármaco(s) suspeito(s), sintomas relatados (compatibilidade com reação de hipersensibilidade a medicamentos), cronologia da reação (tempo entre a última dose e o início dos sintomas, efeito da interrupção do fármaco), existência de reações após re-exposição, e doenças de base do paciente como urticária crônica/ rinossinusite crônica (KOWASKI *et al.*, 2013, DEMOLY *et al.*, 2014).

As reações de hipersensibilidade imediata a AINES foram classificadas de acordo com os critérios propostos pela EAACI/ENDA/GA₂LEN KOWALSKI *et al.* 2013): 1) urticária e/ou angioedema induzidos por AINES (*NSAID-induced urticaria/angioedema - NIUA*); 2) urticária/ angioedema/anafilaxia induzidos por único AINEs (*Single NSAIDs induce urticaria/angioedema/anaphylaxis - SNIUAA*); 3) doença cutânea exacerbada por AINES (*NSAIDs exacerbated cutaneous disease - NECD*); 4) doença respiratória exacerbada por AINES (*NSAIDs exacerbated respiratory disease - NERD*). O diagnóstico de hipersensibilidade seguiu os critérios citados na tabela 1.

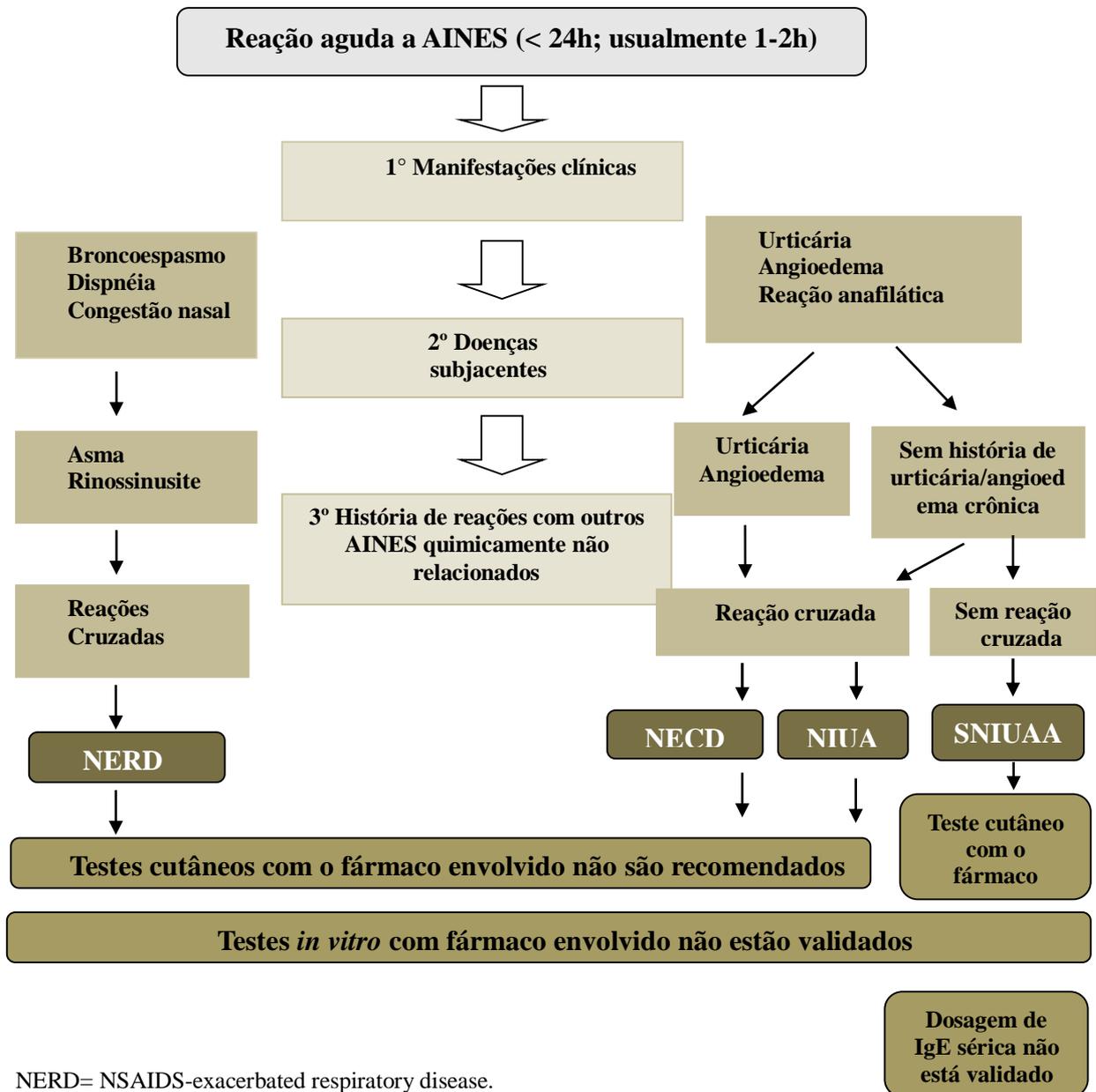
Pacientes com reatividade cruzada a AINES foram orientados a evitarem quaisquer AINES. Após as consultas, esses pacientes receberam um instrumento de alternativa segura nas alergias medicamentosas (anexo B).

QUADRO 4- Critérios para o diagnóstico de reação de hipersensibilidade imediata a AINES

Grupo	Suspeita clínica
Doença respiratória exacerbada por AINES	Relato de exacerbação de doença respiratória incluindo os sintomas: obstrução brônquica induzida por Aspirina®/AINES após 30 min após a ingestão do fármaco. Outros sintomas como rinorréia, congestão nasal, <i>flushing</i> e sintomas gástricos também foram considerados. Episódios repetidos de reações após a administração de AINES de diferentes classes químicas.
Doença cutânea exacerbada por AINES	Relato de episódios repetidos após a administração a um único AINE ou AINES quimicamente relacionados em indivíduos com urticária crônica de base. Os sintomas iniciam entre 0,5 a 6h após a ingestão do fármaco. A exacerbação da urticária crônica também foi desencadeada, muitas vezes, por outros fatores além dos AINES, incluindo estresse, antibióticos ou infecções.
Urticária e/ou angioedema induzidos por AINES	Relato de urticária e/ou angioedema (periorbitário e/ou labial e/ou laríngeo) geralmente na primeira hora após a ingestão do fármaco (reações imediatas (cerca de 15 minutos) ou tardias (até 6 horas) também foram consideradas; Episódios repetidos da reação após a administração de pelo menos dois AINES quimicamente distintos em indivíduos outrora saudáveis; ausência de urticária crônica ou asma como doença de base.
Urticária e/ou angioedema ou anafilaxia a um único AINE	Relato de urticária e/ou angioedema (periorbitário e/ou labial e/ou laríngeo) minutos após a ingestão do fármaco pelas vias oral ou intravenosa. Reações anafiláticas também foram consideradas; Relato de episódios repetidos a um único AINE ou AINES quimicamente relacionados em indivíduos outrora saudáveis.

A classificação das manifestações agudas de reações de hipersensibilidade a AINES foi realizada de acordo com algoritmos diagnósticos propostos na literatura, como pode ser observado na figura 1.

FIGURA 1. Algoritmo para o diagnóstico de manifestações agudas de reações de hipersensibilidade a AINES



FONTE: Adaptado de Kowalski *et al.* (2013) e Menezes *et al.* (2014)

Foram selecionados para a etapa seguinte do estudo somente pacientes que apresentaram história anterior ou atual de urticária e/ou angioedema induzido por AINES (reação cruzada a AINES quimicamente não relacionados). Considerando que o mecanismo dessas reações esteja relacionado com a superprodução dos leucotrienos cisteínicos, os testes cutâneos não foram realizados nesses pacientes e o diagnóstico foi predominantemente clínico (KOWALSKI *et al.*, 2013; BROCKOW *et al.*, 2013).

4.2.3 Genotipagem

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico de pacientes e controles. A coleta de sangue foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), Faculdade de Farmácia, UFC. Foram utilizados na coleta tubos Vacutainer® contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tamponado. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.500 rotações por minutos (RPM) durante 10 minutos. O plasma foi descartado e as amostras foram mantidas a -20°C até o momento da extração.

A extração de DNA foi realizada através do método de coluna utilizando o kit HiPuraTM® (HIMEDIA, Índia) seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA foi determinada através de densidade óptica em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®, EUA).

4.2.3.1 Amplificação do material genético e análise das frequências de polimorfismos em genes alvos

Foram realizadas as análises das frequências dos polimorfismos nos genes *IL10* (-1082 G/A), *IL4* (-589 C/T), *CTLA 4* (+49 A/G) e *DAO* (+8956 C/G) através da técnica de Restrição de Fragmentos no Comprimento de Restrição associada com a Reação em Cadeia da Polimerase (RFLP-PCR).

Antes da amplificação, 30ng de DNA genômico, 7,4 µL de água injetável, iniciadores senso e anti-senso e o Master Mix® (LGC, Brasil), ajustando-se o volume final para 20 µL foram adicionados a um tubo de reação. A seguir, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação, com auxílio de um termociclador (modelo Applied Biosystems Gen Amp 2720). Os iniciadores utilizados estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3. Iniciadores utilizados na amplificação de fragmentos gênicos de IL-10 (-1082 G/A), IL-4 (-589 C/T), CTLA-4 (+49A/G) e DAO (+8956 C/G)

SNP	INICIADORES	REFERÊNCIAS
IL-10 (-1082 G/A)	F: 5'CCAAGACAACACTACTAAGGCTCCTTT-3' R: 5'-GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA-3'	Koch <i>et al.</i> , 2001
IL-4 (-589C/T)	F: 5'-ACTAGGCCTCACCTGATACG-3' R: 5'-GTTGTAATGCAGTCCTCCTG-3'	Qiao <i>et al.</i> , 2005
CTLA-4 (+49 A/G)	F: 5'-AAGGCTCAGCTGAACCTGGT-3' R: 5'-CTGCTGAAACAAATGAAACCC-3'	Wong <i>et al.</i> , 2006
DAO (+8956 C/G)	F: 5'-GGTCACCTGAACCCGGTTAAC-3' R: 5'-TTGTGACCTCTGAACTTGCCG-3'	Ayuso <i>et al.</i> , 2007

As condições de tempo e temperatura para amplificação estão descritas na tabela 4.

TABELA 4. Condições para a realização da reação em cadeia da polimerase

Etapas da PCR	Temperatura	Ciclos	Tempo
IL-10 (-1082 G/A)			
Desnaturação inicial	94°C	1	4min
Desnaturação	94°C	35	40
Anelamento	56°C	35	35
Extensão	72°C	35	40
Extensão final	72°C	1	5min
IL-4 (-589 C/T)			
Desnaturação inicial	95°C	1	5min
Desnaturação	94°C,	35	30 seg
Anelamento	59°C	35	60 seg
Extensão	72°C	35	30 seg
Extensão final	72°C	1	10min

Etapas da PCR	Temperatura	Ciclos	Tempo
CTLA-4 (+49 A/G)			
Desnaturação inicial	94°C	1	5min
Desnaturação	94°C	35	30seg
Anelamento	58°C	35	30seg
Extensão	72°C	35	30seg
Extensão final	72°C	1	7 min
DAO (+8956 C/G)			
Desnaturação inicial	94°C	1	2min
Desnaturação	94°C	40	25seg
Anelamento	61°C	40	60seg
Extensão	72°C	40	60seg
Extensão final	72°C	40	5min

4.2.3.2 Análise do polimorfismo (-1082 G/A) no gene *IL 10*

O protocolo para análise do polimorfismo no promotor da interleucina-10 (-1082 G/A) foi realizado conforme Rodrigues *et al.* (2012).

Os *amplicons* de 377pb foram analisados através de corrida de eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob uma diferença de potencial de 100 volts durante 15 minutos. A revelação foi realizada utilizando SYBR® Safe (Invitrogen, Thermo Scientific, Brasil), um corante fluorescente que se liga aos ácidos nucleicos. O gel foi exposto a uma fonte de luz do transiluminador Modelo LT- 10 x 15 blue (Loccus Biotecnologia, Brasil). Posteriormente, os produtos da PCR foram incubados com a endonuclease de restrição *XagI* (*EcoNI*) (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) por 14-16 horas a 37°C.

Em seguida, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, sob uma diferença de potencial de 100 volts durante 1 hora. Como produtos de digestão, foram obtidas duas bandas de 280+97pb para o genótipo AA, três bandas de 253+97+27pb para o genótipo GG, e quatro bandas de 280+253+97+27pb para o genótipo GA (heterozigoto), segundo Resende *et al.* (2010).

4.2.3.3 Análise do polimorfismo (-589 C/T) no gene *IL 4*

O protocolo para a reação em cadeia da polimerase no promotor da interleucina-4 (-589 C/T) foi realizado de acordo com QIAO *et al.* (2005).

Após a obtenção dos produtos de PCR de 195pb, realizou-se a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP). O protocolo para análise do polimorfismo na região promotora do gene *IL 4* (-589 C/T) foi realizado de acordo com QIAO *et al.* (2005) e Kamali- Sarvestani *et al.* (2007).

Os produtos de PCR foram incubados com a endonuclease de restrição *AvaII* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C por 14-16 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% sob uma diferença de potencial de 100 volts por 1 hora e revelado através da coloração por prata. Como produtos de digestão, foram obtidas duas bandas de 174 + 21 pb para o genótipo CC, uma banda de 195 pb para o genótipo TT, e três bandas 195 + 174 + 21pb para o genótipo CT (heterozigoto), segundo QIAO *et al.* (2005).

4.2.3.4 Análise do polimorfismo (+49 A/G) no gene *CTLA 4*

O protocolo para análise do polimorfismo na região codificadora (+49 A/G) do gene da molécula regulatória CTLA-4 foi realizado conforme proposto por Milicic *et al.* (2001) e Wong *et al.* (2006).

Os produtos de PCR de 152pb foram analisados através de corrida de eletroforese em gel agarose 1,5%, sob uma diferença de potencial de 100V durante 15 minutos. A revelação foi realizada utilizando SYBR® Safe e visualizada com auxílio de um transiluminador.

Os produtos de PCR foram incubados com a enzima de restrição *BstEII* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) por 14-16 horas a 37°C. Após a etapa de restrição, as amostras de restrição foram submetidas a uma corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% sob uma diferença de potencial de 100 volts por 1 hora e revelado através da coloração por prata.

Os produtos de digestão obtidos foram, uma banda de peso molecular 130 +22pb para o genótipo AA, uma banda de 152pb para o genótipo GG, e três bandas de 130+22+152 pb para o genótipo AG (heterozigoto).

4.2.3.5 Análise do polimorfismo (+8956 C/G) no gene DAO

O protocolo para análise do polimorfismo na região codificadora (+8956 C/G) do gene da enzima diamino oxidase foi realizado conforme proposto por García-Martín *et al.* (2006) e Ayuso *et al.* (2007).

Após a etapa de amplificação, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel poliacrilamida a 6% e revelados por prata, e posteriormente foram incubados com a enzima de restrição *AvaII* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) por 14-16 h a 37°C. Em seguida, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, sob uma diferença de potencial de 100 volts durante 1 hora.

Como produtos de digestão foram obtidas duas bandas de 369+107pb para o genótipo CC, três bandas de 252+ 117+107pb para o genótipo GG, e quatro bandas de 369 + 252 +117 + 107pb para o genótipo CG (heterozigoto). As informações resumidas sobre os produtos de PCR, as endonucleases utilizadas e os produtos da etapa de restrição estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Posição do polimorfismo, amplicons, endonucleases de restrição e fragmentos de digestão

Posição do Polimorfismo	Amplicons (pb)	Endonuclease de restrição	Fragmentos de digestão (pb)
IL-10 (-1082 G/A)	377	<i>XagI</i>	280 + 97 (alelo A) 253+97+27 (alelo G)
IL-4 (-589C/T)	195	<i>Ava II</i>	195 (alelo T) 174 + 21 (alelo C)
CTLA-4 (+49 A/G)	152	<i>BstEII</i>	152 (alelo G) 130 + 22 (alelo A)
DAO (+8956 C/G)	476	<i>Ava II</i>	369 + 107 (alelo C) 252 + 117 + 107 (alelo G)

4.3 Análise estatística

A análise dos polimorfismos nas amostras dos pacientes que apresentaram ou não reação cruzada a AINES foi realizada através do teste de Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher. Calculou-se a razão de chances (*Odds ratio* -OR) utilizando um intervalo de confiança de 95%. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada polimorfismo usando a calculadora *online* Michael H. Court's (2005–2008) (COURT; MICHAEL, 2012). As análises foram efetuadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, EUA (GraphPad Prism, Inc., La Jolla, CA, USA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como nível de significância estatística.

5. RESULTADOS

Do total de pacientes recrutados (n=87), 77 (88,5%) compareceram à avaliação clínica no Ambulatório de Dermatologia do HUWC. As consultas aconteciam duas vezes por mês com a presença da alergologista Dra. Janaira Fernandes Severo Ferreira, colaboradora externa à Instituição, uma vez que o HUWC não possui em seu quadro de profissionais um especialista na área. As histórias clínicas dos casos foram documentadas em prontuários do próprio hospital para eventuais consultas posteriores.

O diagnóstico foi fundamentado principalmente no relato do paciente, sendo considerado conclusivo em 57 avaliações (Tabela 6): 54 pacientes (94,73%) foram diagnosticados com urticária e/ou angioedema induzidos por AINES e três pacientes (5,26%) foram diagnosticados com doença cutânea exacerbada por AINES, ou seja, pacientes com urticária crônica como doença de base que apresentavam exacerbação da doença após a utilização de AINES.

Um total de 20 avaliações clínicas permaneceram inconclusivas. Não houve confirmação de diagnóstico de pacientes com doença respiratória exacerbada por AINES e nem de reações de urticária e angioedema a único AINE. Esses pacientes foram excluídos do estudo.

TABELA 6. Diagnóstico dos pacientes com hipersensibilidade a AINES de acordo com a classificação EAACI/ENDA (2013)

Tipo de reação	Manifestação clínica	Doença de base	Reatividade cruzada	Pacientes n=57
Urticária e/ou angioedema induzidos por AINES	Urticária e/ou angioedema	Sem doenças crônicas de base	sim	54 (94,73%)
Doença cutânea exacerbada por AINES	Urticária e/ou angioedema	Urticária crônica	sim	3 (5,26%)

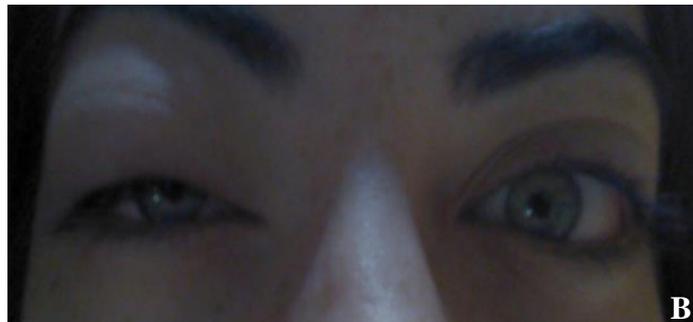
EAACI/ENDA: European Academy of Allergy and Clinical Immunology/European Network for Drug Allergy

Os pacientes com urticária/ angioedema induzidos por AINES (n=54) foram selecionados para comporem o grupo caso. Destes, 36 pacientes (66,66%) pertenciam ao sexo

feminino e 18 (32,72%) pertenciam ao sexo masculino. A mediana de idade nesse grupo foi de 33 anos variando de 18-64 anos.

Todos os pacientes apresentaram um ou mais episódios de reação (urticária e/a angioedema) a pelo menos dois grupos químicos de AINES, o que auxiliou na confirmação do diagnóstico. Nas figuras 2 (A e B), estão demonstrados dois casos de reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES.

FIGURA 2. Angioedema induzido por AINES. A- Paciente com angioedema periorbitário bilateral após a utilização de dipirona. B- Paciente com angioedema periorbitário em olho direito após a utilização de ácido acetilsalicílico.

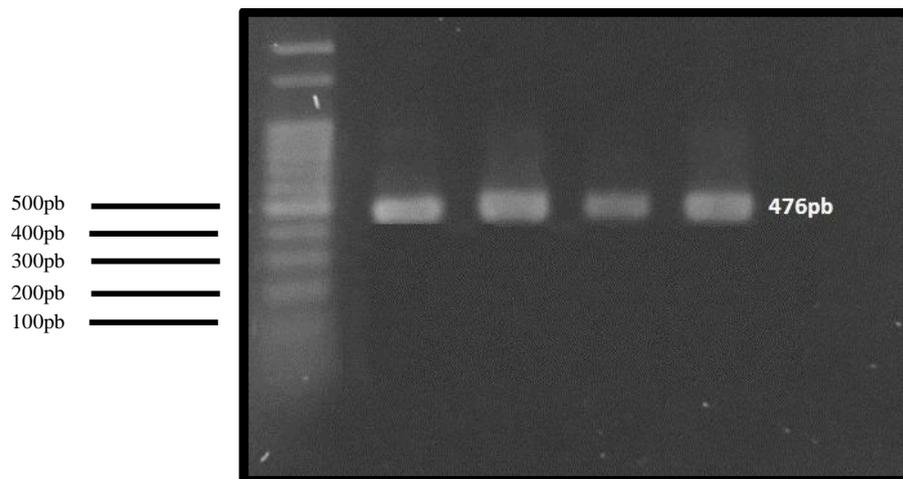


FONTE: própria

Para fins de controle, foram incluídos na fase de genotipagem um total de 95 indivíduos, selecionados exclusivamente entre doadores de sangue no HEMOCE, que não tinham história anterior de hipersensibilidade a AINES, pareados por sexo e idade aos casos. O pareamento foi realizado na proporção caso-contróles 1:1,76. Entre os indivíduos controles, 61 (64,21%) pertenciam ao sexo feminino e 34 (35,78%) pertenciam ao sexo masculino. A mediana de idade foi semelhante à observada nos casos (32 anos), variando de 19-65 anos.

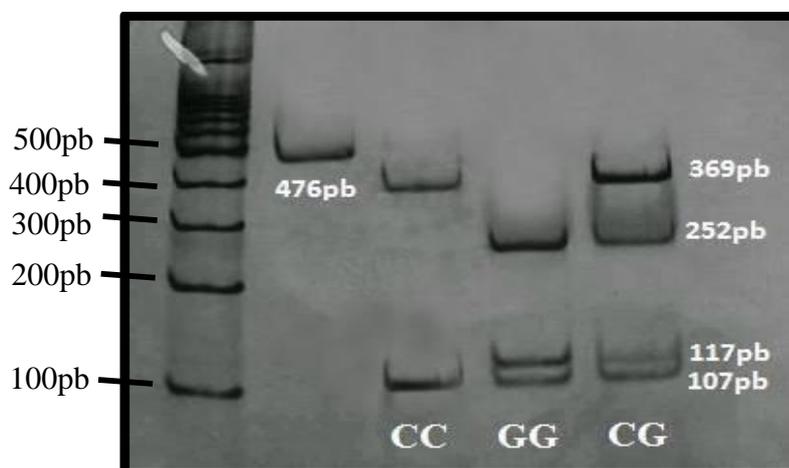
A genotipagem para os polimorfismos alvo foi realizada nos casos (n=54) e controles (n=95). A primeira etapa de amplificação através da técnica de PCR foi realizada em segmentos específicos para análise dos polimorfismos IL-10 (-1082G/A), IL-4 (-589 C/T), CTLA-4 (+49 A/G) e *DAO* (+8956 C/G). A figura 3 mostra o produto da PCR de um segmento de 476pb do gene *DAO* em gel de agarose 1,5%.

FIGURA 3. Amplificação do fragmento de 476 pb do gene *DAO* em gel de agarose



Na figura 4 pode ser observado um exemplo dos produtos de restrição em poliacrilamida 6%, obtidos após o processo de restrição dos amplicons de 476pb da enzima *DAO* com endonuclease de restrição.

Figura 4. Produto da restrição do fragmento gênico da *DAO* em poliacrilamida



Quanto a análise das distribuições genóticas, verificou-se que para IL-10 (-1082G/A), IL-4 (-589 C/T), CTLA-4 (+49 A/G) e DAO (+8956 C/G) nos grupos caso e controle, as mesmas obedeceram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,613$).

A distribuição genotípica e a frequência alélica de IL-10 -1082 G/A estão apresentadas na tabela 7. Verificou-se que houve uma maior frequência do genótipo -1082AG no grupo de pacientes (57,4%) em relação ao grupo controle (38,9%), indicando que o genótipo AG pode estar relacionado com a ocorrência de reação de hipersensibilidade não alérgica a AINES, como pode ser verificado pela *Odds ratio*, a qual indicou uma probabilidade aumentada de 2,57 vezes mais chance de ter reação a AINES quando o indivíduo era portador do genótipo AG [$p=0,018$, OR=2,57 (1,22-5,37)].

Na análise da frequência alélica, os resultados mostraram uma maior frequência do alelo G no grupo de pacientes que apresentaram reação de hipersensibilidade a AINES quando comparado com o grupo controle, indicando que os pacientes são mais frequentemente portadores do alelo -1082G (41,7%) que os indivíduos controles (28,9%) [$p=0,025$, OR=1,75 (1,07-2,87)]. Dessa forma, na presença do alelo -1082G há maior risco de hipersensibilidade não alérgica a AINES.

TABELA 7. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (-1082 G/A) do gene *IL 10* em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle

Polimorfismo	Controles n=95	Casos n=54	OR (IC 95%)	p valor
Genótipos				
AA	49 (51,6%)	16 (29,6%)	Referência	
AG	37 (38,9%)	31 (57,4%)	2,57 (1,22-5,37)	0,018*
GG	9 (9,5%)	7 (13,0%)	2,38 (0,76-7,43)	
GG+AG	46 (48,4%)	38 (70,4%)	2,53 (1,24- 5,14)	0,010*
Alelos				
A	135 (71,1%)	63 (58,3%)	Referência	
G	55 (28,9%)	45(41,7%)	1,75 (1,07-2,87)	0,025*

* Significância estatística

IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio

A distribuição genotípica e a frequência alélica de CTLA-4 (+49 A/G) para casos e controles estão apresentados na tabela 8.

A análise da frequência genotípica mostrou que o genótipo +49AG estava significativamente menos frequente em pacientes em relação aos controles [$p = 0,012$; OR: 0,36 (IC: 0,17-0,78)]. Os genótipos AG +GG (52,7 %) também estavam significativamente menos frequentes entre os pacientes em relação ao grupo controle (71,3%) [$p = 0,033$; OR: 0,45 (IC: 0,22- 0,90)]. Esses resultados indicam que a presença do alelo +49G e a menor expressão de CTLA-4 estão relacionados a um menor risco de hipersensibilidade não alérgica a AINES, o que pode ser verificado pela *Odds Ratio* de 0,45.

TABELA 8. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (+49 A/G) de CTLA-4 em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle

Polimorfismo	Controles n =95	Casos n =54	OR (IC 95%)	p valor
Genótipos				
AA	27 (28,8%)	26 (47,3%)	Referência	-
AG	49 (52,1%)	17 (30,9%)	0,36 (0,17- 0,78)	0,012*
GG	18 (19,1%)	12 (21,8%)	0,69 (0,28-1,72)	0,495
AG + GG	67 (71,3%)	29 (52,7%)	0,45 (0,22-0,90)	0,033*
Alelos				
A	103 (54,8%)	69 (62,7%)	Referência	-
G	85 (45,2%)	41 (37,3%)	0,72 (0,44-1,17)	0,181

Teste de Fisher: * Significância estatística ($p < 0,05$)
IC: Intervalo de Confiança; OR Odds Ratio

A distribuição genotípica e a frequência alélica de DAO (+8956 C/G) para casos e controles estão apresentados na tabela 9. A análise da distribuição genotípica do polimorfismo +8956 C/G da enzima DAO mostrou que o genótipo +8956GG estava significativamente mais frequente no grupo controle em relação ao grupo de pacientes [$p = 0,026$; OR= 0,12 (IC: 0,01 – 0,97)]. O alelo G em homozigose ou heterozigose está associado a uma menor atividade da enzima DAO e maior disponibilidade de histamina. Então, na população estudada, portadores

do genótipo GG tem um menor risco de desenvolverem hipersensibilidade não alérgica a AINES.

TABELA 9. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (+8956 C/G) do gene *DAO* em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle

Polimorfismo	Controles n =95	Casos n =54	OR (IC 95%)	p valor
Genótipos				
CC	37 (38,9%)	26 (48,1%)	Referência	-
CG	46 (48,4%)	27 (50,0%)	0,83 (0,42-1,67)	0,725
GG	12 (12,4%)	1 (3,6%)	0,12 (0,01- 0,97)	0,026*
GG+CG	58 (60,8%)	28 (53,6%)	0,69 (0,35-1,35)	0,304
Alelos				
C	120 (63,20%)	79 (73,1%)	Referência	-
G	70 (36,80%)	29 (26,9%)	0,63 (0,37-1,06)	0,078

Teste de Fisher: * Significância estatística ($p < 0.05$)

IC: Intervalo de Confiança; OR Odds Ratio

Nenhuma associação significativa foi observada ao serem analisados as diferenças entre a distribuições genotípicas e alélicas para o polimorfismo no gene *IL4* (-589 C/T) para casos e controles, conforme está demonstrado na tabela 10.

TABELA 10. Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo (-589 C/T) do gene *IL 4* em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES e grupo controle

Polimorfismo	Controles n =95	Casos n =54	OR (IC 95%)	p valor
Genótipos				
CC	35 (36,8%)	28 (51,8%)	Referência	-
CT	45 (47,4%)	21 (38,9%)	0,58 (0,28-1,20)	0,151
TT	15 (15,8%)	5 (9,3%)	0,42 (0,13-1,29)	0,189
CC+CT	60 (63,2%)	26 (48,2%)	0,54 (0,27-1,07)	0,086
Alelos				
C	75 (39,5%)	31 (28,7%)	Referência	-
T	115 (60,5%)	77 (71,3%)	1,62 (0,97-2,69)	0,62

Teste de Fisher: * Significância estatística ($p < 0.05$)
IC: Intervalo de Confiança; OR Odds Ratio

Foram investigadas as combinações entre os genótipos e alelos de *IL-10 -1082*, *IL-4 -589*, *CTLA-4 +49* e *DAO +8956* para verificar se a presença concomitante desses genótipos seria um fator de risco para hipersensibilidade não alérgica a AINES.

A tabela 11 mostra que a presença concomitante dos genótipos no gene *IL10 -1082AG* junto com o genótipo *IL-4 -589CC* estava associada a um risco 3,5 vezes maior para hipersensibilidade não alérgica a AINES, conforme pode ser verificado pela *Odds Ratio* [$p = 0,031$; OR:3,58 (IC:1,16-11,04)].

Outra associação estatisticamente significante encontrada está relacionada a presença do alelo *IL-4 -589T (CC+CT)* concomitante com o alelo *IL-10 -1082G (AG+GG)*. Observou-se que essa combinação pode estar relacionada a um menor risco para hipersensibilidade não alérgica a AINES, ou seja, a presença desse alelo constitui um fator de proteção [$p = 0,047$, OR: 0,39 (IC: 0,39-0,96)], conforme pode ser visualizado na tabela 12.

TABELA 11. Combinação dos genótipos dos genes *IL10* (-1082) e *IL4* (-589) em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES (n=54) e grupo controle (n=95)

Polimorfismo	Polimorfismo	Controles n=95	Casos n=54	OR (IC 95%)	p valor
IL-10 (-1082)	IL-4 (-589)				
AA	CC	21 (22,1%)	8 (14,8%)	-	-
AA	CT	21 (22,1%)	7 (13,0%)	0,87 (0,27-2,85)	1,000
AA	TT	7 (7,4%)	1 (1,9%)	0,37 (0,040 – 3,55)	0,649
AG	CC	11 (11,6%)	15 (27,8%)	3,58 (1,16-11,04)	0,031*
AG	CT	20 (21,1%)	12 (22,2%)	1,57 (0,53-4,66)	0,430
AG	TT	6 (6,3%)	4 (7,4%)	1,75 (0,39-7,88)	0,693
GG	CC	3 (3,2%)	5 (9,3%)	4,37 (0,84-22,72)	0,100
GG	CT	4 (4,2%)	2 (3,7%)	1,31 (0,20-8,63)	1,000
GG	TT	2 (2,1%)	0 (0,0%)	0,51 (0,02- 11,68)	1,000

Teste de Fisher: * Significância estatística ($p < 0.05$);

IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio

TABELA 12. Combinação dos alelos dos genes *IL10* (-1082) e *IL4* (-589) em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES (n=54) e grupo controle (n=95)

Polimorfismo	Controles n=95	Casos n=54	OR (IC 95%)	p valor
IL-10 -1082 (AA) combinado com:				
IL-4- 589 CC	21 (42,9%)	8 (50,0%)	-	
IL-4- 589 CT+TT	28 (57,1%)	8 (50,0%)	0,75 (0,24-2,33)	0,773
IL-10 -1082 (AG+GG) combinados com:				
IL-4- 589 CC	14 (30,4%)	20 (52,6%)	-	
IL-4- 589 CT+TT	32 (69, 6%)	18 (47,4%)	0,39 (0,16-0,96)	0,047*

Teste de Fisher: * Significância estatística ($p < 0.05$)

IC Intervalo de Confiança; OR Odds Ratio

6. DISCUSSÃO

As reações de hipersensibilidade a AINES são classificadas em dois grupos principais: no primeiro, os sintomas são induzidos por diferentes AINES não relacionados quimicamente, caracterizando uma intolerância cruzada, reatividade cruzada ou reação não alérgica. No segundo grupo estão as reações seletivas, nas quais as reações são induzidas por um único AINE ou um grupo químico específico, havendo uma boa tolerância aos demais fármacos quimicamente não relacionados (BLANCA-LOPEZ *et al.*, 2009).

As reações de intolerância ou reatividade cruzada ocorrem em três tipos de manifestação: (1) doença respiratória exacerbada por AINES, a qual ocorre em pacientes com doenças das vias respiratórias pré-existentes, (2) doença cutânea exacerbada por AINES, na qual os pacientes possuem urticária crônica como doença de base e (3) urticária e/ou angioedema induzida por AINES (em indivíduos sem história de urticária crônica) (KOWASLKI *et al.*, 2013; PHAM *et al.*, 2016). Essas reações acontecem por mecanismos não imunológicos, relacionados principalmente à inibição da COX-1. Por outro lado, as reações seletivas aos AINES se manifestam principalmente através de dois tipos de reações: (1) urticária/ angioedema/anafilaxia induzidas por único AINE, as quais se desenvolvem imediatamente após a administração do fármaco (mediadas por IgE e mastócitos) e (2) hipersensibilidade tardia induzidas por AINES, as quais surgem dias ou semanas após a administração do fármaco e são mediadas por linfócitos T (PHAM *et al.*, 2016).

Nesse estudo, a maioria dos pacientes (n=57; 74,02%) apresentou história clínica compatível com reatividade cruzada a AINES. Dados da literatura estimam que cerca de 70% dos casos de hipersensibilidade a AINES correspondam aos casos de reatividade cruzada, enquanto as reações seletivas somente 30% (CANTO *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-BORGES *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2014).

Alguns estudos que avaliaram pacientes com hipersensibilidade a AINES mostraram uma maior frequência de reações envolvendo reatividade cruzada. Donã e colaboradores (2010), ao avaliarem 659 pacientes com história sugestiva de hipersensibilidade a AINES, verificaram que 503 casos (76,2%) foram classificados como reatividade cruzada a AINES e 156 casos (23,7%) como respondedores seletivos. Caimmi *et al.* (2012) e Nissen *et al.* (2015) em estudos semelhantes, observaram uma porcentagem semelhante de paciente com reatividade cruzada, 74,7% e 76,3%, respectivamente.

No presente estudo, três pacientes apresentaram doença cutânea respiratória exacerbada por AINES, ou seja, apresentavam exacerbação de urticária crônica após a administração de AINES.

Urticária crônica é definida como a presença recorrente de pápulas pruriginosas eritematosas por mais de 6 semanas. As causas de urticária crônica nem sempre são elucidadas, mas dentre as etiologias conhecidas estão urticária autoimune, urticárias físicas (por frio, colinérgicas ou de pressão tardia) e urticária idiopática, na qual a causa é desconhecida. Os principais fatores desencadeadores incluem dieta, álcool, infecções virais, calor, fricção, estresse e medicamentos. Aspirina e outros AINES agravam a urticária crônica em 20-30% dos pacientes durante a fase ativa da doença (SACHDEVA *et al.*, 2011).

A presença de urticária crônica como doença de base foi considerada um fator de exclusão para a fase de genotipagem. O objetivo foi evitar a inclusão de casos de reação de hipersensibilidade (principalmente urticária) cujos fatores desencadeantes fossem outros que não exclusivamente aqueles desencadeados por AINES. Pacientes com história sugestiva de doença respiratória exacerbada por AINES ou que apresentavam história sugestiva de reação de urticária e angioedema a único AINE também foram excluídos da fase de genotipagem. Essa exclusão se deu devido a necessidade de outros testes confirmatórios que não estavam disponíveis (como por exemplo, o teste de provocação).

Em anos recentes, o interesse pelos mecanismos envolvidos nas reações de hipersensibilidade a AINES têm crescido sobremaneira, particularmente para doença respiratória exacerbada por AINES e doença cutânea exacerbada por AINES (CORNEJO-GARCÍA *et al.*, 2012). O objetivo de alguns estudos foi investigar a influência de polimorfismos genéticos funcionais capazes de modificar a resposta do indivíduo a esses fármacos, e assim, possibilitar um rastreamento da susceptibilidade individual. Por isso, nesse estudo, polimorfismos em genes que codificam moléculas envolvidas em mecanismos regulatórios, como citocinas (IL-10, IL-4) também foram estudadas, incluindo CTLA-4 (KIM *et al.*, 2010; PHAM *et al.*, 2016).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina imunoregulatória importante produzida por linfócitos T reguladores, linfócitos auxiliares Th2 e monócitos. Sua função primordial é limitar as respostas inflamatórias, inibindo a produção de citocinas por linfócitos TCD4⁺ dos perfis Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5). Na presença de IL-10, os linfócitos tornam-se irreversivelmente anérgicos e irresponsivos (GUGLIELMI *et al.*, 2006; QIAO *et al.*, 2007). Efeitos adicionais de IL-10 consistem na regulação do crescimento e diferenciação de

diversos tipos celulares, incluindo linfócitos B, células *Natural Killer*, linfócitos T, mastócitos granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (MOORE *et al.*, 2001).

O gene *IL 10* contém cinco éxons e está localizado no braço longo do cromossomo 1, entre 1q31 e 1q32, ocupando aproximadamente 5,1kb. São conhecidos na região promotora, três SNPs situados nas posições -1082 A/G, -819 T/C e -592 C/A os quais modificam a produção de IL-10. (QIAO *et al.*, 2007). O nível de produção dessa citocina é determinado principalmente pela taxa de síntese de RNA mensageiro (RNAm), a qual depende dos polimorfismos nos promotores. Em relação ao polimorfismo na posição -1082, o genótipo GG está relacionado a uma alta produção dessa citocina, o genótipo AG a uma produção intermediária de IL-10, enquanto o genótipo AA está associado a uma baixa produção de IL-10 (TURNER *et al.*, 1997).

Nossos resultados mostraram que o genótipo AG estava associado a uma probabilidade aumentada de reação de hipersensibilidade a AINES. A presença do genótipo AG aumentou em 2,5 vezes o risco de hipersensibilidade a AINES. Dessa forma, podemos entender que níveis intermediários de IL-10 podem favorecer a susceptibilidade à hipersensibilidade a AINES. A análise da frequência alélica mostrou que o alelo -1082G é um fator de risco para hipersensibilidade não alérgica a AINES.

Não há relatos anteriores de associação entre polimorfismos funcionais no gene *IL10* e reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES. No entanto, a regulação da produção dessa citocina parece interferir no desenvolvimento de reações alérgicas a fármacos. Por exemplo, nós observamos em um estudo anterior que o genótipo -1082AA está mais frequente em pacientes HIV positivos alérgicos ao efavirenz do que em pacientes não alérgicos (RODRIGUES *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que uma menor produção de IL-10 representa um maior risco de pacientes HIV positivos desenvolverem uma resposta alérgica ao Efavirenz.

Outros estudos associam a baixa produção de IL-10 e o desenvolvimento de alergia a fármacos. Um estudo realizado por QIAO *et al.* (2007), concluiu que o alelo -1082A estava significativamente mais frequente em pacientes alérgicos a penicilina quando comparado ao grupo controle ($p=0,006$). Um estudo semelhante realizado por Guglielmi *et al.* (2006) verificaram que pacientes francesas atópicas e heterozigóticas para os alelos -819T e -592A apresentavam um maior risco para hipersensibilidade a beta-lactâmicos mediada por IgE. Os alelos -819T e -592A sempre estão associados ao alelo -1082A e direcionam para uma menor produção de IL-10.

Está descrito na literatura que a baixa produção de IL-10 contribui para o

desenvolvimento de respostas alérgicas devido ao menor efeito inibitório sobre os linfócitos Th2/Th1/Th17 em pacientes alérgicos. Níveis elevados de IL-10 refletem em um maior controle imunoregulatório e limitação dessas respostas (QIAO *et al.*, 2007; PHAM *et al.*, 2016).

Então, comparando o presente estudo com os estudos realizados por Guglielmi *et al.* (2006) e Rodrigues *et al.* (2014), conclui-se que indivíduos que produzem níveis menores de IL-10 estão mais susceptíveis a reações mediadas por IgE e linfócitos T enquanto níveis intermediários de IL-10 representaram, no presente estudo, um fator de risco para as reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES. Essa tese propõe que, em indivíduos susceptíveis, níveis intermediários de IL-10 estariam contribuindo para respostas não alérgicas aos AINES por mecanismos ainda não esclarecidos.

Um interessante estudo desenvolvido em uma população coreana (KIM *et al.*, 2009) analisou a influência de polimorfismos na região promotora de IL-10 (1082A/G, 819T/C e 592A/C) e do fator de transformação do crescimento beta 1 e (TGF- β 1) (-589 C/T) no desenvolvimento de NERD. Os autores verificaram que carreadores dos alelos -1082G IL-10 e -589T TGF- β 1, associados com uma maior produção de IL-10 e TGF- β 1, respectivamente, apresentavam um maior risco para NERD (KIM *et al.*, 2009). O gene *TGF β 1* está localizado no cromossomo 19, em uma região associada à predisposição genética a asma. TGF- β 1 é fortemente expresso em resposta a inflamação nasal na rinite alérgica podendo contribuir para a inflamação eosinofílica e também na exacerbação de rinosinusite em pacientes com doença respiratória exacerbada por AINES (KIM *et al.*, 2007). Kim e colaboradores (2009), considerando que os pacientes apresentavam doença alérgica respiratória de base (asma), sugerem que a maior produção de IL-10 e TGF- β 1 está associada a um efeito estimulatório sobre o perfil Th2, influenciando assim o desencadeamento das reações de hipersensibilidade a AINES. Os autores argumentam, que a IL-10 pode atuar como uma citocina regulatória e estimulatória da produção de linfócitos B e que o genótipo -1082 GG de IL-10 está associado a exacerbação de asma conforme demonstrado na literatura (ROUSSET *et al.*, 1992; HUNNINGHAKE *et al.*, 2008).

Comparando os resultados de Kim e colaboradores com o presente trabalho, podemos constatar que os fenótipos de reações de hipersensibilidade a AINES estudados foram distintos nos dois estudos, influenciando as conclusões. Kim *et al.* (2009) estudaram doença respiratória exacerbada por AINES e sugerem a participação de IL-10 como um fator estimulatório dos *status* atópico dos pacientes, pois os mesmos apresentavam asma como doença de base. No presente estudo, essa associação não foi realizada, pois os pacientes apresentavam urticária e/ou angioedema induzido por AINES, no qual não há doença atópica

de base.

Alguns autores sugerem que uma investigação mais detalhada quanto aos polimorfismos na região promotora de genes de citocinas (incluindo IL-10) e reações de hipersensibilidade não alérgica seja realizada (OUSSALAH *et al.* 2016).

A IL-4 é uma citocina central do perfil Th2, cuja principal função é estimular a produção de IgE por linfócitos B e induzirem a diferenciação de linfócitos Th2 (KAMALI-SARVESTANI *et al.*, 2007). O gene *IL4* está localizado no cromossomo 5 e devido ao seu papel chave quanto a produção de IgE e indução da inflamação, o mesmo possui uma participação fundamental no desenvolvimento da asma alérgica e atopia (QIAO *et al.*, 2005).

São conhecidos 19 SNPS no gene *IL 4*. A produção de IL-4 é parcialmente controlada por uma substituição funcional C/T na posição -589 do gene *IL 4* (KAMALI-SARVESTANI *et al.*, 2007). A presença do alelo -589T está associada a uma produção aumentada dessa citocina, e o alelo -589C com menores níveis de produção de IL-4 (CANTAGREL, *et al* 1999; BABULA, *et al.*, 2005). Assim, esse polimorfismo foi estudado em diferente populações quanto à sua associação com asma e doenças alérgicas.

No presente trabalho, não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo IL-4 (-589 C/T) quando comparados casos e controles, conforme os dados da tabela 10. No entanto, constatou-se uma associação entre os genótipos IL-10 -1082AG e IL-4-589CC, mostrando que indivíduos que possuem ambos os genótipos tem 3,5 vezes a probabilidade de apresentarem hipersensibilidade a AINES. Esse resultado sugere que indivíduos que produzem níveis intermediários de IL-10 e baixos níveis de IL-4 estão mais susceptíveis a reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES.

Estudos já realizados mostram que a baixa produção de IL-10 e a alta produção de IL-4 estão relacionados ao desenvolvimento de doença atópica e reações alérgicas aos medicamentos, principalmente aos beta-lactâmicos, por mecanismos mediados por IgE e mastócitos (QIAO *et al.*, 2005; QIAO *et al.*, 2007). Um estudo publicado recentemente pelo nosso grupo confirmou esses achados, pois verificou-se uma associação combinada entre os alelos IL-4 -589T (CT+TT) e IL-10 -1082A (AG+AA) em pacientes alérgicos ao efavirenz ($p=0,015$; OR = 15.970, 95 % IC = 0,8477-300,9). Ou seja, a presença concomitante do alelo IL-10 -1082A (AG + AA) e IL-4 -589T (CT + TT) aumentou o risco de alergia ao efavirenz em aproximadamente 16 vezes. Dessa maneira, a presença combinada do alelo -1082A no gene *IL10* e do alelo -589T no gene *IL4* pode resultar em uma baixa produção de IL-10 e elevada produção de IL-4, tornando o indivíduo susceptível à alergia por efavirenz (RODRIGUES *et*

al., 2017).

Quanto às reações de hipersensibilidade a AINES, Kim e colaboradores (2010) investigaram a associação entre o polimorfismo -589C/T da citocina IL-4 em pacientes com NERD. Os autores verificaram que o alelo polimórfico -589T estava significativamente associado com doença respiratória exacerbada por AINES ($p < 0,05$), indicando que uma maior produção de IL-4 estava relacionada às manifestações clínicas desses pacientes.

Uma metanálise publicada por Li *et al.* (2008), utilizando uma base de dados chinesa, verificou que o polimorfismo -589 C/T estava associado ao *status* atópico e um maior risco de asma e doença alérgica. Micheal *et al.* (2013) também investigaram a associação do referido polimorfismo com asma e atopia na população paquistanesa. Os autores encontraram uma associação significativa entre o polimorfismo -589 C/T e atopia. O alelo T estava presente em maior frequência nos casos comparativamente aos controles (46,8% vs 39,2%).

A molécula CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen- 4*) é um membro da superfamília das imunoglobulinas expressa sobre linfócitos T CD4⁺ ativados que compartilha uma homologia com CD28. Ambos se ligam às moléculas B7 sobre a superfície de células apresentadoras de antígenos (APCS). Ao contrário das moléculas CD28, CTLA-4 tem alta afinidade com as moléculas B7, resultando em sinais negativos para a célula T. Assim, a interação entre CTLA-4 e B7 interfere na ativação de células T e pode mediar a apoptose, contribuindo para a tolerância periférica (MILICIC *et al.*, 2000, LEE *et al.*, 2001).

Polimorfismos no gene *CTLA 4*, principalmente o SNP +49 A/G, afetam a imunoregulação e aumenta o risco de doenças auto-imunes e alérgicas. A substituição do alelo A pelo G promove a troca do aminoácido treonina por alanina e está relacionada a atenuação da inibição de células T direcionada por CTLA-4 (MAURER *et al.*, 2001). Assim, vários estudos mostram que o polimorfismo +49 A/G está associado com doenças auto-imunes, incluindo doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, esclerose múltipla e lupus eritematoso sistêmico (MAURER *et al.*, 2002; PAVKOVIC *et al.*, 2003) e também com doenças atópicas (asma e rinite) (YANG *et al.*, 2004).

Existe uma relevante associação entre uma menor expressão de CTLA-4 e o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas. Uma meta-análise publicada por Yao *et al.* (2015) avaliou 15 estudos caso-controles de diferentes populações (incluindo chineses, japoneses, alemães, australianos) os quais associavam o polimorfismo (+49 A/G) e asma atópica. Os autores constataram que houve uma maior frequência dos genótipos GG/GA *versus* AA (OR = 0.71; 95% IC: 0.51-0.99; $P = 0.04$) entre pacientes com asma atópica quando comparado ao grupo controle em caucasianos. A significativa associação entre a presença do alelo G e uma

menor expressão de moléculas CTLA-4 na população caucasiana atópica sugere ativação de linfócitos Th2, e conseqüentemente aumento da produção de citocinas IL-4, IL-13 e IL-5, além da produção de IgE, aumentando o risco de atopia e de desenvolvimento de alergia e asma. Por outro lado, um estudo realizado por Yang *et al* (2004) em uma população asiática verificou que o genótipo AA e a maior expressão de CTLA-4 estava significativamente associada a uma maior produção de IgE e rinite alérgica em mulheres chinesas.

Analisando esses estudos, os mesmos indicam que a correlação entre o polimorfismo (+49A/G) e as doenças alérgicas podem ser diferentes entre as etnias e populações, sugerindo que outros fatores estejam influenciando os resultados, incluindo fatores ambientais e aqueles relacionados à cada população (idade, proporção de pacientes do sexo masculino ou feminino, gravidade das reações) (Yang *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostraram que, para o polimorfismo +49 A/G de CTLA-4, os genótipos AG e GG foram mais frequentes em controles do que em casos. Além disso, quando os indivíduos apresentavam um desses genótipos, havia um menor risco de hipersensibilidade a AINES [p=0,033, OR: 0,45 (95% IC: 0,22- 0,90)]. O alelo +49G está relacionado a uma menor expressão da molécula regulatória e conseqüentemente a uma menor inibição das respostas imunes mediadas por moléculas de CTLA-4. O resultado observado sugere que os portadores do alelo +49G (AG+GG) e com atividade reduzida de CTLA-4 apresentam um menor risco de hipersensibilidade a AINES, estando portanto o referido alelo associado a um efeito protetor. Até o momento, o presente estudo é o primeiro a avaliar a associação entre CTLA4-4 e hipersensibilidade não alérgica a AINES em uma população brasileira.

A teoria da ciclooxigenase está estabelecida como o principal mecanismo das reações de hipersensibilidade não alérgicas a AINES. Essa teoria propõe que as reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES resultam da inibição da COX-1, desvio do metabolismo do ácido araquidônico em direção a via das lipoxigenases, desencadeando uma produção exacerbada de CisLT- LTC4, LTD4 e LTE4. Os CisLT são peptídeos derivados do ácido araquidônico provenientes da via da enzima 5-lipoxigenase produzidos principalmente por eosinófilos e mastócitos (SZCZEKLIK *et al.*, 2007). Após sua secreção, LTC4 é metabolizado a LTD4 e LTE4. Os CisLT são considerados potentes mediadores do processo inflamatório e do processo de formação do angioedema e da urticária (MITA *et al*, 2001). A injeção intradérmica de CisLT promove a formação de pápula e vermelhidão em pacientes com urticária crônica ou em indivíduos saudáveis (MAXWELL *et al*, 1990) sendo 100 vezes mais potentes que a histamina (ASERO, 2007).

A histamina e outros mediadores inflamatórios derivados de mastócitos ativados

provavelmente participam dos mecanismos de hipersensibilidade não alérgica a AINES. Como já foi explicado, essa hipótese se deve ao uso consagrado de anti-histamínicos no manejo terapêutico da urticária e/ou angioedema desencadeado por AINES (KOWASLKI *et al.*, 2011; AGÚNDEZ *et al.*, 2012; AYUSO *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Mita *et al.* (2001) verificou um aumento significativo de metabólitos da histamina na urina de pacientes com doença respiratória exacerbada por AINES, após estes terem sido provocados com esses medicamentos. Outros estudos demonstraram uma associação entre a administração de aspirina em pacientes com hipersensibilidade a AINES e o consequente aumento da concentração de LTE4 em fluidos corporais, como urina, e em exsudatos nasal e broncoalveolar. A excreção urinária de LTE4 é considerado um marcador eficiente da produção dessa molécula no corpo humano (MITA *et al.*, 2001; KAWAGISHI *et al.*, 2002; MASTARLEZ *et al.*, 2004).

A histamina é produzida por mastócitos e basófilos e após sua liberação, metabolizada por duas enzimas, a N-metil-transferase, responsável pela inativação da histamina no cérebro e a enzima diaminoxidase (DAO), responsável pela eliminação extracelular. Um menor catabolismo da histamina decorrente da menor atividade da DAO pode desencadear o acúmulo de altos níveis de histamina e intolerância, e pode levar a sintomas que mimetizam uma reação alérgica, como dor de cabeça, flushing, rinite, e com menos frequência, sintomas cardiovasculares, prurido e outros. A associação entre polimorfismos no gene DAO e a apresentação de doenças alérgicas já está demonstrada (MAINTZ; NOVAK, 2007). A atividade enzimática da enzima DAO também foi extensamente estudada como um marcador da integridade intestinal. Diversos SNPS no gene *DAO* foram associados com doença de Crohn, colite ulcerativa e adenoma de colón (PETERSEN *et al.*; 2002; PETERSEN *et al.*, 2003; SCHWELBERGER *et al.*, 2003). Também há relatos de associações com doenças inflamatórias, neoplásicas e alergia alimentar (PETERSEN *et al.*, 2005).

Em anos recentes, surgiu a hipótese de que polimorfismos relacionados a homeostase da histamina, incluindo genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese ou catabolismo da histamina, poderiam modificar a resposta clínica ou o tempo de resposta das reações de hipersensibilidade a AINES. Acredita-se que uma menor atividade da enzima DAO e menor catabolismo da histamina esteja relacionado aos sintomas observados em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES (GARCÍA-MARTIN *et al.*, 2007; AGÚNDEZ *et al.*, 2012).

Para confirmar essa hipótese, polimorfismos localizados em regiões específicas do gene *DAO* (cromossomo 7q34-q36) foram mapeados e estudados. Três polimorfismos não sinônimos, os quais promovem substituição dos aminoácidos Treonina por Metionina na

posição 16 (Th16Met/ rs1056191), Serina por Fenilalanina na posição 332 (Ser332Phe/ rs1049742) e Histidina por Acido aspártico na posição 645 (His645Asp /rs1049793), respectivamente, foram identificados em populações caucasianas como inibidores da diminuição da atividade enzimática da DAO. No entanto, apenas o polimorfismo His645Asp está amplamente aceito (AGÚNDEZ *et al.*, 2012). Ayuso *et al.* (2007) verificaram que, em uma população espanhola caucasiana, a variante 645Asp em homozigose ou heterozigose estava associada a uma menor atividade enzimática da DAO. Nesse estudo, o efeito do SNP Th16Met teve uma menor relevância na inibição da atividade enzimática, e o efeito do SNP Ser332Phe sobre a atividade da DAO foi considerado insignificante (AYUSO *et al.*, 2007).

Devido a importância do polimorfismo His645Asp observada em outros trabalhos, o mesmo foi avaliado no presente estudo em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES. Nossos resultados mostraram que o genótipo GG foi significativamente mais frequente nos indivíduos controles em relação ao pacientes com hipersensibilidade a AINES. O alelo G está relacionado a menor atividade enzimática da DAO e maior disponibilidade de histamina. Esses resultados sugerem uma relação entre o alelo G e proteção quanto a hipersensibilidade não alérgica a AINES. No entanto, houve uma limitação quanto ao número de indivíduos casos estudados. De acordo com a tabela 9, do total de 54 casos presentes no estudo, somente um paciente (n=1) portava o genótipo GG, limitando a possibilidade de conclusões mais precisas.

Agúndez *et al.* (2012) verificaram uma frequência maior do alelo variante polimórfico 16 Met (rs10156191), em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES caucasianos, relacionado a uma menor atividade enzimática da DAO, quando comparados aos controles. Os autores acreditam que a menor capacidade de metabolização da histamina na população estudada pode ser um mecanismo plausível para explicar a frequência aumentada desse variante em indivíduos que desenvolvem sintomas clínicos de hipersensibilidade a AINES.

Um estudo realizado por Kim *et al.* (2009) investigou a associação entre o polimorfismo funcional 939A/G no gene da enzima n-metil-transferase em pacientes com NECD. Os autores constataram através de um estudo funcional *in vivo* que pacientes portadores do alelo 939A apresentavam menor atividade da enzima n-metil-transferase em suas hemácias e maior liberação de histamina de seus basófilos em comparação aos indivíduos controles.

Outros polimorfismos genéticos em hipersensibilidade a AINES descritos na literatura e investigados em outras populações não foram explorados nesse estudo. Como exemplo, o polimorfismo -444 A/C da enzima leucotrieno-4 sintase, enzima que catalisa a etapa limitante da produção de cisteinil leucotrienos, o qual está associado a uma maior produção de

CisLT e maior risco de desenvolvimento de hipersensibilidade não alérgica a AINES (TORRES-GALVAN *et al.*, 2001; MASTARLEZ *et al.*, 2005). Outros alvos são polimorfismos na região promotora dos genes de receptores de CisLT1 (634C/T, 475A/C, e 336A/G), os quais modulam a expressão desses receptores e já foram relacionados a susceptibilidade aumentada de doença respiratória a AINES em estudos anteriores (SOUSA *et al.*, 2002). O alto custo para a realização dos ensaios de PCR limitaram o número de alvos estudados nesse estudo.

Considerando a importância dos mastócitos como produtores de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) e para os mecanismos de ativação celular, polimorfismos em genes relacionados o perfil Th2 de resposta também foram estudados. Por exemplo, Bae *et al.* (2007) verificaram a associação significativa entre o polimorfismo na região promotora do gene que codifica a cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) e hipersensibilidade a AINES em pacientes coreanos com urticária induzida por AINES.

Outro exemplo de estudo envolvendo a participação de citocinas foi o estudo desenvolvido por Kurosawa *et al.* (2016), o qual demonstrou que os genótipos TT/CT do polimorfismo -1111 no gene da interleucina 13 (IL-13) foram mais frequentes que o genótipo CC em pacientes com NERD comparado a um grupo tolerante a aspirina e controles. Os genótipos TT e CT estão associados a maior produção de IL-13. A IL-13 é uma citocina derivada das células Th2 que induzem a produção de IgE pelos linfócitos B e possuem um papel fundamental na doença respiratória induzida por AINES.

Um ponto intrigante nesse assunto é a alta frequência de certos alelos MHC em pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES. QUIRALTE *et al.* (1999) encontraram uma maior frequência de alelos HLA-DR11 em casos quando comparado aos controles (58,8% vs 15,9%) [p <0,001, OR=7,3 (IC= 2,8-19,0)]. Os referido autores ressaltam o papel central das moléculas MHC II no processamento de antígenos exógenos e que uma possível associação entre as moléculas MHC II e as reações de hipersensibilidade seria uma hipótese para explicar os mecanismos envolvidos.

Nas reações de hipersensibilidade alérgica a fármacos, o papel das moléculas de MHC em alergia a medicamentos está mais esclarecido. Por exemplo, existe uma associação entre a presença do alelo HLA-B*57:01 e reação de hipersensibilidade ao abacavir em populações caucasianas, um antiretroviral utilizado no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana- 1 (HIV-1) (BHARADWAJ *et al.*, 2012).

Entre outros alvos estudados, estão os genes que codificam a cicloxigenase 2, os receptores de prostaglandinas, genes da enzima metabolizadora de histamina N-metiltransferase e genes de citocinas pró-inflamatórias (IL-4 e TNF-α) (PHAM *et al.*, 2016).

Nossos resultados sugerem fortemente que polimorfismos presentes no genes *IL10*, *IL4* e *CTLA4* podem influenciar uma susceptibilidade individual dos pacientes ao surgimento das reações de hipersensibilidade a AINES, indicando que indivíduos com níveis intermediários de IL-10, menor expressão de CTLA-4 e baixos níveis de IL-4 são mais propensos a apresentar hipersensibilidade não alérgica a AINES.

No entanto, é preciso considerar que a etiologia das reações de hipersensibilidade a AINES é multifatorial e que provavelmente resultam de efeitos poligenéticos. Como foi descrito, existe uma extensa lista de possibilidades de investigação de polimorfismos de interesse nessa área que já foram investigadas em outras populações e que ainda podem ser explorados na população do presente estudo.

A investigação clínico-laboratorial de pacientes com hipersensibilidade imediata a AINES permanece um desafio global para especialistas e pesquisadores. No Brasil, poucos grupos trabalham com a temática na prática clínica. Existem dificuldades em se determinar os fármacos (s) responsáveis devido à ausência de testes *in vitro* e de testes *in vivo* padronizados. Dessa forma, as alternativas terapêuticas tornam-se limitadas, o que dificulta a conduta clínica em muitas situações (ENSINA *et al.*, 2008; CAIMMI *et al.*, 2012).

O diagnóstico das reações de hipersensibilidade a AINES é baseado principalmente na história clínica detalhada e nos testes de provocação quando indicados (BLANCA- LOPES *et al.*, 2009). No presente estudo, a classificação das reações de hipersensibilidade a AINES foi baseada principalmente na história clínica e somente casos cuja reatividade cruzada aos AINES ficou bem caracterizada foram incluídos. Assim, somente pacientes que apresentaram pelo menos dois episódios de urticária e/ou angioedema indicativos de reação de hipersensibilidade a AINES com dois ou mais fármacos não quimicamente relacionados foram incluídos no estudo.

O teste de provocação foi autorizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HUWC para esse estudo, no entanto, não foi possível realizá-los. A principal limitação foi a deficiência de estrutura física do HUWC e também a indisponibilidade de recursos humanos (enfermeiros e técnicos) para conduzirem quaisquer intervenções nos pacientes. Como o HUWC não possui serviço de emergência, somente uma sala utilizada em sessões de pulsoterapia dispunha dos aparatos exigidos para realização desses testes. Uma possibilidade para estudos futuros é a utilização das instalações da Unidade de Pesquisa Clínica, anexo ao HUWC, a qual vem desenvolvendo estudos clínicos com pacientes provenientes do complexo hospitalar da UFC.

Quanto à investigação dos polimorfismos genéticos e reações de hipersensibilidade não alérgica a AINES, os mecanismos envolvidos não estão completamente elucidados. É possível que haja o envolvimento de fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. Ademais, as

contribuições genéticas podem ser moduladas pela interação com fatores ambientais (BHARADWAJ *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; PHAM *et al.*, 2016).

Em outros países, a busca das bases genéticas para a elucidação dos fatores desencadeantes das reações de hipersensibilidade a medicamentos está bem mais avançada. A contribuição dos SNPS em regiões regulatórias ou codificantes como marcadores da predisposição genética a doenças multifatoriais, incluindo alergia a medicamentos tem se mostrado bastante promissora (SYVANEN *et al.*, 2001).

Até o momento, o presente estudo é o primeiro a realizar a associação entre polimorfismos em genes de citocinas, no genes *CTLA 4* e *DIAMINOOXIDASE* em uma população clinicamente bem caracterizada de pacientes com hipersensibilidade não alérgica a AINES. Esse trabalho representa um importante passo nos estudos envolvendo polimorfismos genéticos e predisposição a hipersensibilidade não alérgica a AINES no Brasil. Há a perspectiva de que, em um futuro próximo, reações de hipersensibilidade a AINES sejam completamente conhecidas e evitadas na população. Para que isso se torne realidade, faz-se necessário um aprofundamento no estudo da influência dos fatores genéticos e ambientais na modificação da resposta do indivíduo a esses fármacos.

7. CONCLUSÕES

01. Do total de 77 pacientes com suspeita de reação de hipersensibilidade a AINES avaliados por alergologista experiente no HUWC, 57 pacientes apresentaram diagnóstico de reações de hipersensibilidade não alérgica ou não alérgica a anti-inflamatórios não esteroidais. Destes, 54 pacientes (94,73%) foram diagnosticados com reações de urticária e/ou angioedema induzidos por AINES e três pacientes (5,26%) com doença cutânea exacerbada por AINES.

02. A análise da distribuição genotípica e da frequência alélica de IL-10 (-1082 G/A) demonstrou que houve uma maior frequência de portadores do genótipo -1082AG e de carreadores do alelo -1082G (AG+GG) no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (38,9% vs 48,4%, respectivamente). Da mesma forma, foi observado uma maior frequência do alelo -1082G no grupo de pacientes (41,7%) quando comparado ao grupo controle (28,9%). Nenhuma associação significativa foi observada quando se analisou as frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismo IL-4 -589 C/T em casos e controles. A análise da distribuição genotípica e da frequência alélica de CTLA-4 (+49 A/G) mostrou que o genótipo +49AG (30,9%) e que os genótipos AG +GG (52,7 %) foram significativamente mais frequentes entre os indivíduos controles em relação ao grupo de pacientes. O alelo +49G, relacionado a uma menor expressão de CTLA-4, esteve associado a um fator de proteção no desenvolvimento de hipersensibilidade não alérgica a AINES. A análise da distribuição genotípica do polimorfismo +8956 C/G da enzima DAO mostrou que o genótipo +8956 GG foi significativamente mais frequente no grupo controle em relação ao grupo de pacientes (12,4% vs 3,6%, respectivamente). O alelo G em homozigose ou heterozigose estava associado a uma menor atividade da enzima DAO e maior disponibilidade de histamina. No entanto, do total de 54 casos presentes no estudo, somente um paciente (n=1) portava o genótipo GG, limitando conclusões mais precisas.

03. Foi encontrada uma associação significativa quanto ao efeito combinado dos SNPs de IL-10 (-1082G/A) e de IL-4 (-589 C/T). Verificou-se que a frequência de indivíduos carreadores dos genótipos IL10-1082AG associado com o genótipo IL4-589CC estava aumentada nos pacientes (27,8%) quando comparada ao grupo controle (11,6%). Assim, indivíduos que possuem simultaneamente os genótipos IL10-1082AG e IL4-589CC

possuem cerca de 3,5 vezes mais chances de desenvolverem uma reação de hipersensibilidade não alérgica a AINES.

REFERÊNCIAS

- ABERER, W. *et al.* Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. **Allergy.**, v. 58, n. 9, p. 854-863, Sep. 2003.
- ABERER, W.; KRANKE, B. Provocation tests in drug hypersensitivity. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 29, n. 3, p. 567-584, Aug. 2009.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Rede Sentinela. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos++Comercializacao++Pos++Uso/Rede+Sentinela>. Acesso em: 04 set. 2015.
- AGÚNDEZ, J.A.G. *et al.* The diamine oxidase gene is associated with hypersensitivity response to non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Plos One.**, v. 7, n 11, p. e47571, Nov. 2012.
- ASERO, R. Clinical management of adult patients with a history of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced urticaria/angioedema: update. **Allergy Asthma Clin Immunol.**, v. 3, n. 1, p.24-30, Mar. 2007.
- AYUSO, P. *et al.* Genetic variability of human diamine oxidase: occurrence of three nonsynonymous polymorphisms and study of their effect on serum enzyme activity. **Pharmacogenet Genomics.**, v. 17, n. 9, p. 687-693, Sep.2007.
- BABULA, O. *et al.* Frequency of Interleukin-4 (IL-4) -589 Gene Polymorphism and Vaginal Concentrations of IL-4, Nitric Oxide, and Mannose-Binding Lectin in Women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Clin Infect Dis.**, v. 40, n. p. 1258-1262, May. 2005.
- BAE, J.S. *et al.* Significant association of FcεRIa promoter polymorphisms with aspirin-intolerant chronic urticaria. **J Allergy Clin Immunol**, v.119, n.2, p449–456, Jul. 2007.
- BARBAUD, A. Skin testing in delayed reactions to drugs. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 29, n. 3, p. 517-535, Aug. 2009.
- BAVBEEK S.; CELIK G.; OZER F.; MUNGAN, D.; MISIRLIGIL, Z. Safety of selective COX-2 inhibitors in aspirin/NSAID-intolerant patients: comparison of nimesulide, meloxicam and rofecoxib. **J Asthma.** v. 41, n.1, p. 67–75, Feb. 2004.
- BHARADWAJ, M. *et al.* Drug hypersensitivity and human leukocyte antigens of the major histocompatibility complex. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 52, n. p. 401-431, 2012.
- BIRCHER, A.J.; HOFMEIER, K.S. Drug hypersensitivity reactions: Inconsistency in the use of the classification of immediate and nonimmediate reactions. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 129, n. 1, p. 263-264, Jan. 2012.
- BLANCA-LOPEZ, M. *et al.* Non Steroids Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) intolerance versus allergy: patterns of response and drug involved. **J Allergy Clin Immunol**; 123: S239. Feb. 2009.
- BOUSQUET, P.J. *et al.* Provocation tests in diagnosing drug hypersensitivity. **Curr Pharm**

Des. v. 14, n. 27, p. 2792-2802. 2008.

BROCKOW, K. *et al.* General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. **Allergy**. v. 57, n. 1, p. 45-51, Jan. 2002.

BROCKOW, K. *et al.* Skin test concentrations for systemically administered drugs—an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. **Allergy**. v. 68, n. 6, p. 702-12, Apr. 2013.

BROCKOW, K. *et al.* Guideline for the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: S2K-Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) and the German Dermatological Society (DDG) in collaboration with the Association of German Allergologists (AeDA), the German Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA), the German Contact Dermatitis Research Group (DKG), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the Austrian Society for Allergology and Immunology (ÖGAI), the German Academy of Allergology and Environmental Medicine (DAAU), the German Center for Documentation of Severe Skin Reactions and the German Federal Institute for Drugs and Medical Products (BfArM). **Allergo J Int.** v. 24, n 3, p. 94-105. Jan. 2015.

BRUNE, K.; HINZE, B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. **Arthritis and Rheumatism**. v. 50. n. 8, p.2391-2399, Aug. 2004.

CAIMMI, S. *et al.* How Can We Better Classify NSAID Hypersensitivity Reactions? – Validation from a Large Database. **Int Arch Allergy Immunol.** v. 159, n. 3, p.306-12, Jun. 2012.

CANTAGREL, A. *et al.* Interleukin-1b, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms, Relationship to Occurrence and Severity of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis and rheumatism**. v. 42. n. 6. p. 1093-1100, Jun.1999.

CANTO, M.G. *et al.* Selective immediate hypersensitivity reactions to NSAIDs. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 293-297, Aug. 2009.

CHOI J.H. *et al.* Leukotriene-related gene polymorphisms in ASA intolerant asthma: an association with a haplotype of 5-lipoxygenase. **Hum Genet.** v. 114, n. 4, p. 337–344, Mar. 2004.

CORNEJO-GARCÍA, J. A., *et al.* Hypersensitivity reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Curr Drug Metab.** v. 10, n. 9, p. 971-980, Nov. 2009.

CORNEJO-GARCÍA, J. A., *et al.* Genetic variants of the arachidonic acid pathway in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced acute urticaria. **Clin Exp Allergy.**, v. 42, n.2, p. 1772-1781. Dec. 2012.

COURT MH, MICHAEL H (2012) Court's (2005–2008) online calculator. Tuft University Web site.

DAHER, S. *et al.* Diagnóstico em Doenças Alérgicas Mediadas por IgE - Asbai. **Rev. bras.**

alerg. imunopatol. v. 32, n. 1, p. 3-8, Jan. 2009.

DEMOLY, P.; KROPF, R.; BIRCHER, A.; PICHLER, W. J. Drug hypersensitivity: questionnaire. **Allergy.**, v. 54, n. 9, p. 999-1003, Sep. 1999.

DEMOLY, P. *et al.* International Consensus on drug allergy. **Allergy.**, v. 69, n. 4, p. 420-437, Apr. 2014.

DOÑA, I. *et al.* Characteristics of subjects experiencing hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs: patterns of response. **Clin Exp Allergy.**, v 41, n. 1, p. 86–95. Jan. 2010.

EDWARDS-SMITH, C.J. *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology.** v. 30, p. 526-530, 1999.

ENSINA F.L.C. Teste de provocação em indivíduos com hipersensibilidade aos antiinflamatórios não-esteroidais – Proposta de uma abordagem prática. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** v. 31, n. 2, p. 60-63, Jan. 2008.

Epidemiologia básica / R. Bonita, R. Beaglehole, T. Kjellström; [tradução e revisão científica Juraci A. Cesar]. - 2.ed. - São Paulo, Santos. 2010.

GARCÍA-MARTÍN, E., *et al.* Polymorphisms of histamine-metabolizing enzymes and clinical manifestations of asthma and allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy.** v. 37, n.8, p. 1175-1182, Aug. 2007.

GUGLIELM, L. *et al.* IL-10 promoter and IL4-R α gene SNPs are associated with immediate β -lactam allergy in atopic women. **Allergy.**, v. 61, n. 8, p. 921-927, Jul. 2006.

GRATTAN, C. E. H. Aspirin sensitivity and urticaria. **Clin Exp Dermatol.**, v. 28, n.2, p. 123-27. Mar. 2003.

GROSSER, T; SMYTH, E; FITZGERALD, GA. Agentes anti-inflamatórios não esteroides, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota. In:BRUNTUN, LL; CHABNER, BA; KNOLLMANN, BC. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12.ed Porto Alegre: AMGH, 2012.cap.34, p. 981-1026.

HEINZERLING, L. *et al.* The skin prick test – European standards. **Clin Transl Allergy.** v. 3. n.3, p.1-10, Feb. 2013.

HUNNINGHAKE, G.M. *et al.* Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 122, n.1, p. 93-98, Jul. 2008.

KAMALI-SARVESTANI, E.; GHAYOMI, M.A.; NEKOEI, A. Association of TNF-alpha-308 G/A and IL-4-589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran. **J Investig Allergol Clin Immunol.**, v. 17, n. 6, p. 361-366, 2007.

KAWAGISHI, Y. *et al.* Leucotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. **J Allergy Clin.**, v. 109, n. 6, p. 936-942, Jun. 2002.

KENNEDY MJ, *et al.* Association of the histamine N-methyltransferase C314T (Thr105Ile) polymorphism with atopic dermatitis in Caucasian children. **Pharmacotherapy.**, v. 28, n.12, p.1495-1501, Dec. 2008.

KHAN, D. A.; SOLENSKY, R. Drug allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 125, n. 2, p. 126-37, Feb. 2010.

KIM, S.H. *et al.* Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with ASA induced urticaria and ASA-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population. **J Korean Med Sci.** v. 20, n.6, p.926-31, Dec. 2005.

KIM, S.H. *et al.* Cysteinyl leukotriene receptor 1 promoter polymorphism is associated with aspirin-intolerant asthma in males. **Clin Exp Allergy.** v.6, n.4, p.433-439, Apr. 2006.

KIM, S-H.; PARK, H-S Genetic Markers for Differentiating Aspirin-Hypersensitivity. **Yonsei Med J.**, v. 47, n 1, p. 15-21, Feb. 2006.

KIM S-H. *et al.* Cysteinyl leukotriene receptor 1 promoter polymorphism is associated with aspirin-intolerant asthma in males. **Clin Exp Allergy.**, v. 36, n. 43, p. 3–9, Apr. 2006.

KIM S-H. *et al.* Association between a TGFbeta1 promoter polymorphism and rhinosinusitis in aspirin-intolerant asthmatic patients. **Respir Med.** v.101, n. 3, p. 490–495, Mar. 2007.

KIM S-H *et al.* Combined effect of IL-10 and TGF-b1 promoter polymorphisms as a risk factor for aspirin-intolerant asthma and rhinosinusitis. **Allergy.** v. 64, n.8, p. 1221-1225, Aug. 2009.

KIM S-H, *et al.*, 2010. Genetic and ethnic risk factors associated with drug hypersensitivity. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** v. 10, n. 4, p. 280-90, Aug. 2010.

KIM, S-H.; SANAK, M.; PARK, HS. Genetics of Hypersensitivity to Aspirin and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 33, n. 2, p. 1-18, May. 2013.

KOCH, W. *et al.* Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. **Atherosclerosis.**, v.159, n. 1, p. 137-44. Nov. 2001.

KOWALSKI, M.L. *et al.* Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA# and GA2LEN/HANNA*. **Allergy.**, v. 66, n.7, p. 818–29, Jul. 2011.

KOWASLKI, M.L. *et al.* Classification and practical approach to the diagnosis and management of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Allergy.**, v. 68, n. 10, p. 1219-1232, Oct. 2013.

KOWALSKI, M.L; MAKOWSKA, J. S. Seven Steps to the Diagnosis of NSAIDs Hypersensitivity: How to Apply a New Classification in Real Practice? **Allergy Asthma**

Immunol Res. v. 7, n. 4, p. 312–320. Jul. 2015.

KUROSAWA, M. *et al.* Hypothetical Mechanism of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease Based on Recent Investigations of Gene Polymorphisms in Japanese Patients. **J Allergy Ther.**, v. 7, n. 1, p.1-10, Feb. 2016.

KRANKE, B., ABERER, W. Skin testing for IgE-mediated drug allergy. **Immunol Allergy Clin N Am.**, v. 29, n. 3, p. 503–516, Aug. 2009.

LACHAPELLE, J-M.; MAIBACH, H.I. Patch Test Methology. In: LACHAPELLE, J-M.; MAIBACH, H.I. Patch Testing and Prick Testing: a practical guide. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2009: 11-70.

LAM, B.K.; AUSTEN, K.F. Leukotriene C 4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, v. 68, p. 511-520, Aug. 2002.

LEE, Y. H. *et al.* Polymorphisms of the CTLA-4 exon 1 and promoter gene in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 10, n. 9, p. 601-605, 2001.

LI *et al.* Association between C 589T polymorphisms of interleukin 4 gene promoter and asthma: a meta-analysis. **Respir Med.**, v. 102, n. 7, p. 984-992, Jul. 2008.

LIGERS *et al.* CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. **Genes Immun.**, v. 2, n. 3, p.145-52, May. 2001.

LIMDI, N.A.; VEENSTRA, D.L. Expectations, validity, and reality in pharmacogenetics. **J Clin Epidemiol.** v. 63, n.9, p. 960-969, Sep. 2010.

LINSINGEN, R. V. Polimorfismos de genes de citocinas e do gene mica em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical. 2008. 124p. Tese (Doutorado em Genética), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2008.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, p. 1185–1196, 2007.

MASTALERZ, L *et al.* Hypersensitivity to aspirin: Common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 113, n.4, p.771-775, Apr. 2004.

MASTARLEZ, L. *et al.* Mechanism of Chronic Urticaria Exacerbation by Aspirin. **Curr Allergy Asthma Rep.**, v. 5, n. 4, p.277–283, Jul. 2005.

MÄURER, M. *et al.* A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1+ 49) alters T-cell activation. **Immunogenetics.**, v. 54, n., p. 1-8. Apr. 2002.

MAXWELL, D.L.; ATKINSON, B.A.; SPUR, B.W. *et al.* Skin responses to intradermal histamine and leukotrienes C4, D4, and E4 in patients with chronic idiopathic urticaria and in normal subjects. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 86, n.5, p.759–765, Nov. 1990.

MEDEIROS Jr. Urticária e angiodema. In: Geller, M; Scheinberg, M. Diagnóstico e tratamento

das doenças imunológicas para Clínico, pediatras e residentes. 1.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005. Cap. 27, p.209-215.

MENEZES, U. P.; CORDEIRO, D. L.; MELO, J. M. L. Aspectos práticos no diagnóstico e manejo das reações de hipersensibilidade a fármacos. **Bras J Allergy Immunol.** v. 2, n.3, p.91-96. Maio. 2014.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D.C.; TANUS-SANTOS J.E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina, Ribeirão Preto.** v. 39, n. 4, p. 515-521, Out-Dez. 2006.

MICHEAL, S. et al. IL-4 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and allergic rhinitis in Pakistani patients. **J Investig Allergol Clin Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 107-111, 2013.

MILICIC, A.; BROWN, M. A.; WORDSWORTH. B. P. Polymorphism in codon 17 of the CTLA-4 gene (+ 49 A/G) is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in British Caucasians. **Tissue Antigens.** v. 58, n.1, p.50-54, Jul. 2001.

MIRAKIAN, R. et al. BSACI guidelines for the management of drug allergy. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 39, n. 1, p. 43-61, jan. 2009.

MITA, H et al. Possible involvement of mast-cell activation in aspirin provocation of aspirin-induced asthma. **Allergy.**, v. 56, n. 11, p. 1061-1067. Nov. 2001.

MOORE K.W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** v. 19, p. 683-765, 2001.

MUNTKE-KAAS, M.C. *et al.* CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the TH1/TH2 paradigm. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 114, n. 2, p. 280-287, Aug. 2004.

NISSEN, C.V. *et al.* Hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): classification of a Danish patient cohort according to EAACI/ENDA guidelines. **Clin Transl Allergy.** v. 5, n. 10, p. 1-10, Mar. 2015.

ORTEGA, N. *et al.* Practical guidelines for diagnosing hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Investig Allergol Clin Immunol.** v. 24, n. 5, p. 308-23. 2014.

OUSSALAH, A. *et al.* Genetic variants associated with drugs-induced immediate hypersensitivity reactions: a PRISMA-compliant systematic review. **Allergy.** v. 71, n.4, p.443-462. 2016.

PAVKOVIC, M. *et al.* CTLA-4 exon 1 polymorphism in patients with autoimmune blood disorders. **Am J Hematol.** v. 72, n. 2, p. 147-149, Feb. 2003.

PETERSEN J.; RAITHEL, M.; SCHWELBERGER, H.G. Histamine N-methyltransferase and diamine oxidase gene polymorphisms in patients. **Inflamm Res.**, v. 51, Suppl 1, p.91-92, 2002.

PETERSEN J. *et al.* Analysis of genetic polymorphisms of enzymes involved in histamine metabolism. **Inflamm Res.**, v. 52, Suppl 1: p.69–70, 2003.

PETERSEN, J.; RAITHEL, M.; SCHWELBERGER, H.G. Characterisation of functional polymorphisms of the human diamine oxidase gene. **Inflamm Res.**, v. 54 Suppl 1, p. 58-59, Apr. 2005.

PHAM, D.L. *et al.*, What we know about nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. **Korean J Intern Med.**, v. 31, n. 3, p. 417-432. May, 2016.

PICHLER, W.J. Deciphering the immune pathomechanism of cutaneous drug reactions. **Allergy.** v. 57, Suppl. 72, p. 34–36, Aug. 2002a.

PICHLER, W.J. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. **Curr. Opin. Allergy & Clin. Immunol.**, v.2, n. 4, p. 301-305, 2002b.

PICHLER, W.J. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. **Med Clin North Am.** v. 94, n. 4, p. 645-64, Jul. 2010.

QIAO, H. L.; Yang, J.; Zhang, Y.W. Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4Ra in patients with penicillins allergy. **Allergy.** v. 60, n.8, p. 1053-1058, Aug. 2005.

QIAO, H. L. *et al.* Association of IL-10 level and IL-10 promoter SNPs with specific antibodies in penicillin-allergic patients. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 63, n. 3, p. 263-269, Mar. 2007.

QUIRALTE, J. *et al.* Association of HLA-DR11 with the anaphylactoid reaction caused by nonsteroidal anti-inflammatory drug. **J Allergy Clin Immunol.** v. 103, n 4.p. 685-689. Apr. 1999.

RESENDE, R.G. *et al.* Investigation of Functional IL-10 Gene Polymorphism and IL-10 Levels in Acute Graft-Versus-Host Disease. **J Clin Immunol.** v. 30, n 3, p. 465-73, May. 2010.

RINALDO-MATTHIS, A; HAEGGSTROM, J.Z. Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 676-681, Jun. 2010.

RODRIGUES, R.O. **Identificação do polimorfismo na região promotora da interleucina 10 na posição -1082 (G>A) em pacientes portadores de HIV em tratamento com efavirenz.** 2012. 47f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RODRIGUES, R.O. *et al.* Interleukin 10 gene polymorphism (-1082G/A) and allergy to efavirenz in patients infected with human immunodeficiency virus. **Braz J Infect Dis.**, v. 18, n.4, p.445-448, Jul-Aug. 2014.

RODRIGUES, R.O. *et al.* Association of IL10, IL4, IFNG and CTLA4 Gene Polymorphisms with Efavirenz Hypersensitivity Reaction in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. **Jpn J Infect Dis.** Feb. 2017

ROMANO, A. *et al.* Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. **J Allergy**

Clin Immunol., v. 127, (3 Suppl), p. 67-73, Mar. 2011.

ROUSSET, F. *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 89, n. 5, p. 1890–1893, Mar. 1992.

SACHDEVA, S. *et al.* Chronic urticaria. **Indian J Dermatol.** v. 56, n.6, p. 622–628. Nov-Dec. 2011.

SANAK, M.; SIMON, H-U.; SZCZEKLIK, A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. **Lancet.**, 350, n. 9091, p.1599-1600, Nov. 1997.

SÁNCHEZ-BORGES, M. *et al.* The multiple faces of nonsteroidal antiinflammatory drug hypersensitivity. **J Investig Allergol Clin Immunol.** v. 14, n. 4, p. 329-34, 2004.

SÁNCHEZ-BORGES, M. *et al.* The A-444C Polymorphism in the Leukotriene C4 Synthase Gene Is Associated With Aspirin-Induced Urticaria. **J Investig Allergol Clin Immunol.**, v. 19, n.5, p. 375-82, 2009.

SÁNCHEZ-BORGES, M. NSAID hypersensitivity (respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms). **Med Clin North Am.**,v. 94, n.4, p. 853-864, Jul. 2010.

SCHNYDER, B. Approach to the patient with drug allergy. **Med Clin North Am.** v. 94, n. 4, p. 665-79. Jul. 2010.

SCHWELBERGER, H.G *et al.* Genetic polymorphisms of histamine degrading enzymes: from small-scale screening to high-throughput routine testing. **Inflamm Res.**, v. 52, p. 71–73, 2003.

SOUSA A.R. *et al.* Leukotriene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. **N Engl J Med.**,v. 347, n. 9, p. 1493–1499, Nov. 2002.

STEVENSON, D.D.; SÁNCHEZ-BORGES, M.; SZCZEKLIK, A. Classification of allergic and pseudoallergic reactions to drugs that inhibit cyclooxygenase enzymes. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 87, n.3, p. 177-80, Sep. 2001.

SYVANEN, A-C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, 2001. v. 2, n. 12, p. 930-942.

SZCZEKLIK A; NIZANKOWSKA-MOGILNICKA, E; SANA, M. Hypersensitivity to aspirin and others NSAIDS: Mechanisms, Clinical Presentation and Management. In: PICHLER, W. J. Drug hypersensitivity. 1st ed. Basel: Karger AG, 2007. cap. 28, p 352-365.

TANNO L.K. *et al.* The Absence of CYP3A5_3 Is a Protective Factor to Anticonvulsants Hypersensitivity Reactions: A Case-Control Study in Brazilian Subjects. **Plos one.**, v. 10, n. 8, p. 1-11, Aug. 2015.

TEIXEIRA, F. M. *et al.* Rifamycin-Associated Postoperative Allergic Contact Dermatitis in a 70-Year-Old Patient. **J Investig Allergol Clin Immunol.**, v. 23, n. 15, p. 282-283, 2013.

THONG, B. Y. H., TAN, T.C. Epidemiology and risk factors for drug allergy. **Br J Clin**

Pharmacol., v. 71, n. 5, p. 684-700, May. 2011.

TORRES-GALVAN, MJ *et al.* LTC₄-synthase A-444C polymorphism: lack of association with NSAID-induced isolated periorbital angioedema in a Spanish population. **Ann Allergy Asthma Immunol**; v. 86, n. 6, p. 506–10, Dec. 2001.

TORRES-GALVAN, MJ *et al.* 5-Lipoxygenase pathway gene polymorphisms: lack of association with asthma in a Spanish population. **J Investig Allergol Clin Immunol**. v. 19, n. 6, p. 453-458, 2009.

TORRES, M.J. *et al.* Hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 34, n. 3, p. 507-524, Aug. 2014.

TURNER, D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet.**, v. 24, n. 1, p.1-8, Feb. 1997.

UEDA, H *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature.**, v. 423, n. 6939, p. 506-511. May. 2003.

Universidade Federal do Ceará. Hospital Universitário Walter Cantídio. Histórico. Disponível em: <<http://www.huwc.ufc.br/site.php?pag=17>>. Acesso em: 04 set. 2015.

VARALDA, D. B.; MOTTA, A.A. Reações adversas aos anti-inflamatórios não esteroidais. **Rev Bras Alerg Immunopatol.**, v. 32, n.1, p. 27-33. Jan. 2009.

WONG, Y.-K. *et al.* Association of CTLA-4 gene polymorphism with oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.**, v. 35, n. 1, p. 51-54, Jan. 2006.

YAO, Y.S. *et al.*, Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and asthma: an updated meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**. v. 8, n. 3, p. 3107-3113, Mar. 2015.

YANG, K. D. *et al.* Polymorphism of the immune-braking gene CTLA-4 (+ 49) involved in gender discrepancy of serum total IgE levels and allergic diseases. **Clin Exp Allergy.**, v. 34, n. 1, p. 32-37, Jan. 2004.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO DE REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A AINES

Investigador responsável

Nome: _____ Data: ___/___/___ Tel/Cel:() _____

Nome paciente: _____ Idade: _____ DN: ___/___/___ Sexo: () M () F
Endereço: _____ Telefone fixo/ celular: _____

- 1.O sr (a) possui alguma doença crônica? Qual (is)? _____
- 2.Faz uso de algum medicamento? Qual (is)? _____
- 3.Em uso de betabloqueador ou inibidor da ECA? Sim () Não ()
- 4.O (a) sr. (a), seus pais e avós são todos nascidos no Ceará? Sim () Não ()
- 5.O sr. (a) já fez uso de anti-inflamatórios não esteroidais para dor, febre e/ou inflamação? Sim () Não ()
- 6.O sr (a) apresentou algum tipo de reação alérgica em decorrência do uso de um ou mais anti-inflamatório? Sim () Não ()

Nome genérico + aditivos	Intervalo de tempo entre a dose e a reação? Até 24h ou mais de 24h?	Reação	Houve reexposição ao mesmo medicamento?
			Não () Sim () Sintomas:
			Não () Sim () Sintomas:
			Não () Sim () Sintomas:

- 7.Qual a duração da reação? () < 6 semanas () > 6m semanas Já teve diagnóstico de urticária crônica? Sim () Não ()
- 8.Houve internação? () Sim () Não
- 9.Foi necessário algum tratamento durante a reação? Qual? _____
- 10.Se reação a um único medicamento: O s.r. (a) já se expôs a algum medicamento da tabela 1?
Se sim, houve alguma reação? _____
- 11.O s.r. (a) possui algum outro tipo de doença alérgica? _____
- 12.Algum familiar já teve algum tipo de reação conhecida a medicamentos? () Sim () Não
Se sim, qual o grau de parentesco? _____ qual a reação do familiar? _____
- 13.O s.r. (a) aceitar participar de um estudo genético para pacientes alérgicos a anti-inflamatórios? Poderá ser necessário uma coleta de sangue e um teste cutâneo com o medicamento implicado. Sim () Não ()

APÊNDICE B- QUESTIONÁRIO PARA INDIVÍDUOS CONTROLES**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
QUESTIONÁRIO- PROJETO ALERGIA A ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS****Questionário para indivíduos controle****Investigador responsável**

Nome: _____ Data: _____ Tel/Cel: () _____
Nome: _____ Idade: _____ DN: ___/___/___ Sexo: () M () F
Número cadastro HEMOCE: _____

1. O sr. (a), seus pais e avós são todos nascidos no Ceará?
 SIM NÃO
2. O (a) sr. (a) já fez uso de anti-inflamatórios não esteroidais (para dor e inflamação)?
 SIM NÃO
3. O sr (a) apresentou algum tipo de reação alérgica em decorrência do uso de um ou mais anti-inflamatório?
 SIM NÃO
4. O (a) senhor consente sua participação em um estudo como indivíduo controle, ou seja não alérgico a anti-inflamatórios não esteroidais e após todas os esclarecimentos, assinar um termo de consentimento livre e esclarecido?
 SIM

APÊNDICE C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) sr. (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) da pesquisa intitulada “ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES DA IL 10, IL 4, CTLA-4, LEUCOTRIENO C4 SINTETASE E DIAMINO OXIDASE EM INDIVÍDUOS COM REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS”. O (a) sr (a) não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Essa pesquisa que tem como principal objetivo realizar um estudo dos determinantes genéticos associados à história de reações adversas aos anti-inflamatórios que o sr. (a) usa para dor e inflamação. Para tanto, precisamos realizar com o sr. (a) um questionário com tempo de 05 minutos para seu preenchimento. Caso o (a) s.r. (a) não tenha história de alergia a esses medicamentos, será incluído no estudo como indivíduo saudável ou controle. Em seguida, o (a) s.r. (a) concorda que durante o processo de doação, sejam reservados aproximadamente 4 ml de sangue divididos em dois tubos diferentes: o primeiro com capacidade para 3 ml e o segundo com capacidade para 5 ml. Essa amostra de sangue será utilizada na aplicação de técnicas que avaliam predisposição genética a alergia a anti-inflamatórios não esteroidais e os resultados serão comparados com amostras de indivíduos alérgicos.

Nessa pesquisa, não há benefício direto para o participante, apenas o bônus de estar contribuindo com o desenvolvimento da pesquisa científica no país. Nós, pesquisadores, garantimos que:

É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem quaisquer prejuízos.

Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.

Dados sobre o responsável pela pesquisa

Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE. Telefones: 3366-8270/ 87227772/ 99200593

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. Declaro estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal _____

Assinatura de quem aplicou o termo/responsável pelo estudo _____

Testemunha _____

APÊNDICE D- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INDIVÍDUOS CONTROLES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) sr. (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) da pesquisa “ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES DA IL 10, IL 4, CTLA-4, LEUCOTRIENO C4 SINTETASE E DIAMINO OXIDASE EM INDIVÍDUOS COM REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS”. O (a) sr (a) não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Essa pesquisa que tem como principal objetivo realizar um estudo dos determinantes genéticos associados à história de reações adversas aos anti-inflamatórios que o sr. (a) usa para dor e inflamação. Para tanto, necessitamos realizar com o sr. (a) um questionário com tempo de 05 minutos para seu preenchimento. Caso o (a) sr (a) não tenha história de alergia a esses medicamentos, será incluído no estudo como indivíduo saudável ou controle.

Em seguida, o (a) sr (a) concorda que durante o processo de doação, sejam reservados aproximadamente **4 ml** de sangue divididos em dois tubos diferentes: o primeiro com capacidade para 3 ml e o segundo com capacidade para 5 ml. Essa amostra de sangue será utilizada na aplicação de técnicas que avaliam predisposição genética a alergia a anti-inflamatórios não esteroidais e os resultados serão comparados com amostras de indivíduos alérgicos.

Nessa pesquisa, não há benefício direto para o participante, apenas o bônus de estar contribuindo com o desenvolvimento da pesquisa científica no país. Nós, pesquisadores, garantimos que:

É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem quaisquer prejuízos.

Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos participantes.

Dados sobre o responsável pela pesquisa

Luciana Mabel Ferreira Vasconcelos Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE. Telefones: 3366-8270/ 87227772/ 99200593

Atenção: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará/Hospital Universitário Walter Cantídio. R. Cap. Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo Fortaleza – CE Fone: 3366-8613

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. Declaro estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Fortaleza, ___/___/___

Assinatura do paciente/representante legal _____

Assinatura de quem aplicou o termo/responsável pelo estudo _____

Testemunha _____

10 ANEXOS

ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO-UFC

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo de IL-4, IL-10, receptor 1 de leucotrieno e da enzima leucotrieno sintase em indivíduos com hipersensibilidade imediatas cutâneas e sistêmicas aos anti-inflamatórios não esteroidais

Pesquisador: LUCIANA MABEL FERREIRA VASCONCELOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16821213.1.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 550.608

Data da Relatoria: 10/02/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado. É um estudo prospectivo, no qual será realizada uma investigação dos casos suspeitos de hipersensibilidade cutânea a anti-inflamatórios

não esteroides em pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio/UFC. Serão avaliadas as relações de causalidade entre a exposição aos fármacos e as reações cutâneas de urticária e angioedema. Em seguida, serão realizados testes cutâneos (teste de puntura, intradérmico e provocação) com os fármacos implicados. Por último, amostras de sangue serão colhidas para estudo farmacogenético, para a pesquisa de polimorfismos que podem estar envolvidos no aparecimento dessas reações alérgicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a frequência de polimorfismos genéticos associados à hipersensibilidade imediatas cutâneas aos anti-inflamatórios não esteroidais em pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio.

Objetivos Secundários:

Realizar testes cutâneos (prick test) e/ou intradérmico com os fármacos suspeitos em pacientes com suspeita de urticária/angioedema a AINES, a fim de caracterizar a população estudada;

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (853)366.-8613

Fax: (853)281.-4961

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 550.608

Verificar se há diferença significativa entre a frequência de polimorfismo na região (-444 A>C) de genes que codificam a LTC4 sintase entre os pacientes e os controles; Verificar se há diferença significativa entre a frequência de polimorfismo nas regiões promotoras dos genes que codificam o receptor 1 de leucotrienos (-634 C>T, -475 A>C e -336 A>G) entre os paciente e os controles; Verificar se há diferença significativa entre a frequência de polimorfismo nas regiões promotoras dos genes que codificam a IL-4 entre os pacientes e os controles.

Verificar se há diferença significativa entre a frequência de polimorfismo nas regiões promotoras dos genes que codificam a IL-10 em entre os pacientes e os controles.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A fase de investigação laboratorial (testes in vivo) é a fase da pesquisa em que estão presentes riscos para o paciente: O principal problema na realização dos testes cutâneos com o fármaco suspeito é o risco de recidiva da reação cutânea ou sistêmica. Recidiva de reações depende principalmente do tipo de teste (puntura, epicutâneo ou intradérmico) e da manifestação clínica que o paciente apresentou no momento da reação. Exceto para o teste intradérmico, os testes de puntura e epicutâneo raramente induzem novas reações alérgicas as quais são mais frequentes durante a realização dos testes intradérmicos, podendo ocorrer em até 10% dos casos. Os testes de contato com fármacos raramente causam novas reações alérgicas, discromias cutâneas, infecções secundárias, ulceração, necrose da pele ou formação de cicatriz. Portanto, esse teste pode ser realizado no ambulatório sem aparato de emergência. Devido ao seu maior risco de reações adversas, o teste intradérmico não será realizado em manifestações clínicas graves: síndrome de Stevens Johnson, necrólise epidérmica tóxica, vasculite leucocitoclástica e rash cutâneo com eosinofilia e sintomas sistêmicos. Em casos de hospitalização devido a uma reação imediata grave (anafilaxia) por medicamentos, o paciente não será exposto novamente ao medicamento suspeito. Devido a esses riscos, os testes de puntura e intradérmicos (realizados quando o teste de puntura é negativo) serão realizados de acordo com os protocolos disponíveis e segundo as recomendações de segurança obtidas da literatura. Esses testes serão feitos com os

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)366.-8613 Fax: (853)281.-4961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 550.608

pacientes em uma sala apropriada e que possui o suporte para atendimentos de emergência. Os testes de contato serão realizados no ambulatório de dermatologia do referido hospital, sob supervisão médica.

Benefícios:

Os testes cutâneos significam a possibilidade de fornecer uma resposta ao paciente sobre sua história clínica sugestiva. Características como simplicidade, rapidez, fácil execução e baixo custo explicam a posição chave desses testes no diagnóstico de alergia. Os estudos para pesquisa de polimorfismos são importantes para confirmar a presença de polimorfismos em genes que estariam relacionados a predisposição de o indivíduo apresentar uma reação alérgica a fármacos, inclusive os AINES. Esse tipo de estudo é primordial para que outras análises sejam realizadas e assim seja possível saber quais grupos de fármacos são considerados imunogênicos ao indivíduo e devem ser evitados pelo mesmo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é exequível, tem financiamento de uma agência de fomento e os pesquisadores envolvidos têm experiência na área (de acordo com os Currículos anexo).

Uma das preocupações em relação ao estudo é o fato de que serão realizados testes cutâneos (teste de puntura, intradérmico e provocação) com os fármacos implicados com as reações cutâneas de urticária e angioedema dos pacientes, o que pode trazer riscos para os mesmos. Entretanto, os pesquisadores afirmam que serão realizados de acordo com os protocolos disponíveis e segundo as recomendações de segurança obtidas da literatura. Além disso, esses testes serão feitos com os pacientes em uma sala apropriada, com suporte para atendimentos de emergência. E os testes de contato serão realizados no ambulatório de dermatologia do referido hospital, sob supervisão médica.

Os pesquisadores pretendem também, após aprovação do comitê de ética, realizar um estudo piloto com 30 pacientes e 60 controles, onde os mesmos vão passar por todas as fases da pesquisa e nesse momento será padronizada a metodologia e corrigidos possíveis equívocos de interpretação de resultados e de análise estatística.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram encaminhados os seguintes documentos:

Termo de consentimento livre e esclarecido (linguagem clara, preservando a confidencialidade, privacidade e liberdade de escolha dos participantes da pesquisa).

Termos de fiel depositário (do chefe do serviço e do SAME).

Declaração de concordância dos pesquisadores.

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (853)366.-8613 **Fax:** (853)281.-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 550.608

Declaração de origem dos recursos financeiros (Fonte Financeira: MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO).

Autorização do local da pesquisa.

Orçamento financeiro detalhado.

Cronograma sem necessidade de ajustes.

Currículo dos pesquisadores envolvidos anexados.

Todos estão adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto eticamente adequado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 10 de Março de 2014

Assinador por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)366.-8613 Fax: (853)281.-4961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

ANEXO B – INSTRUMENTO DE ALTERNATIVA SEGURA NAS ALERGIAS MEDICAMENTOSAS



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO

INSTRUMENTO DE ALTERNATIVAS SEGURAS NAS ALERGIAS
MEDICAMENTOSAS

ORIENTAÇÕES SOBRE REAÇÕES ADVERSAS A AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) /AAS (ácido acetilsalicílico)

Nome paciente:

Data de realização:

Medicamento (s) envolvido(s):

Devido a(s) reação(ões) adversa(s) apresentada(s) pelo paciente com o(s) medicamento (s) supracitados orienta-se evitar os grupos de medicamentos abaixo relacionados.

Grupos de medicamentos a serem evitados

- 1) Derivados de ácido salicílicos: AAS (Aspirina®), Diflunisal (Dorbid)
- 2) Derivados de ácido acético: Diclofenaco (Voltaren, Cataflam), Alcofenaco (Zumaril), Aceclofenaco (Proflan), Indometacina (Indocid), Sulindac (Clinoril), Tolmetin (Tolectin), Zomepirac (Zomax)
- 3) Derivados de ácido Propiônico: Cetoprofeno (Profenid), Ibuprofeno (Motrin, Dalsy, Alivium), Naproxeno (Naprosin), Fenoprofeno (Trandor), Flubiprofeno (Targus, Ocufer-pomadas)
- 4) Derivados de ácido Fenâmico: Ácido mefenâmico (Postan), Ácido tolfenâmico (Fenamic)
- 5) Derivados de Pirazolonas: Dipirona (Novalgina, Magnopyrol), Fenilbutazona (Tanderil), Oxifembutazona (Butazolidina)
- 6) Derivados de Oxicans: Piroxicam (Feldene), Tenoxicam (Tilatil), Meloxicam (Movatec)
- 7) Outros: Nabumetona (Reliflex), Cetorolaco de Trometamina (Toragésico, Acular tópico)

Outras considerações:

- 1) Paracetamol constitui-se, em geral, droga segura, desde que não ultrapasse 500mg/dose. Caso paciente não tenha antecedente de reação ao Paracetamol.
- 2) AINES seletivos COX 2 podem ser alternativas (Celocoxib, etoricoxib, Nimesulida), somente após liberação do seu alergista
- 3) Viminol, analgésico de ação central, em dose 70mg a cada 6-8 horas pode ser uma opção para analgesia
- 4) Cloridrato de Benzidamida (Benflogin) pode ser uma opção terapêutica como antitérmico e analgésico, após liberação do seu alergista.

Fonte: Magalhaes, JB & Carvalho, L.P. Capítulo: Reações adversas a medicamentos usados em reumatologia e ortopedia. In: Alergia clínica-diagnóstico e tratamento. p 600. 2ed.

