

ROSALY VIEIRA DOS SANTOS

**ANÁLISE E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE IMAGENS
FOTOGRAFICAS DIGITAIS E TRIDIMENSIONAIS PARA
LEITURA DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, com área de concentração em Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Maurer**

CURITIBA

2007

Santos, Rosaly Vieira dos

Análise e validação dos métodos de imagens fotográficas digitais tridimensionais para leitura do teste cutâneo por puntura / Rosaly Vieira dos Santos. - Curitiba, 2007

xiii, 52 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Paraná.

1.Anti-histamínicos. 2.Teste cutâneo por puntura. 3.Análise de imagem. 4.Imagem tridimensional. I.Título.

NLM WS 280

Ao meu pai, *in memorium*, e à minha mãe. Vocês
sempre serão as pessoas mais valiosas da minha
vida e o porto seguro para os momentos difíceis,
onde quer que estejamos.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho, orientador desta tese, pelo ensinamento e valiosas sugestões. Sua determinação em sempre buscar o conhecimento e seu incentivo contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores, médicos, enfermeiros, residentes, especializandos, mestrandos, doutorandos e funcionários do Departamento de Pediatria da UFPR, pela contribuição na formação profissional.

Ao Jorge e à Lucinete, secretários do SAM 2, pelo auxílio na busca dos voluntários para a pesquisa.

Em especial, a todos os voluntários que participaram deste estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Marcus Maurer, que me recebeu no Departamento de Alergia do Hospital Charité, dando-me oportunidade para o meu crescimento profissional e pessoal.

A toda equipe do Departamento de Alergia e Dermatologia do Hospital Charité, pela dedicação, compreensão, paciência, oportunidade, ensinamento e amizade. Em especial, ao Prof. Dr. Zuberbier, que me recebeu e abriu as portas do Departamento de Dermatologia; às enfermeiras Nikki e Hesna, pela organização e solicitação dos materiais necessários para os meus estudos; ao Dr. Markus Magerl e Dr. Frank Siebenharr, pela ajuda, especialmente com a língua alemã, durante as reuniões, nos ambulatórios e nos setores burocráticos do hospital; ao Prof. Dr. Martus Peter, pelo auxílio nas análises estatísticas; à Susanne Lescau, pelo incentivo; ao Dr. Nikolas, pelo interesse na cultura brasileira, que fez com que minha adaptação no hospital fosse mais descontraída; à Agnieszka, amiga dentro e fora do hospital; à nutricionista Stephani, pelo auxílio nos testes de provocação – dados que não entraram na tese, mas que me animaram a continuar estudando fora do Brasil; à secretária Karen Ballentin, pela amizade.

Aos amigos doutorandos na Alemanha: Vanete, Ticiane, Aristeu, Leandro, Victor, Danilo, Mateus e Simone, Valter, Anderson, Andrey, Juliano Fellini, Juliano Cabral, Francis, Wendel, Hans, Maria, Karen e Alireza. O companheirismo que

tivemos durante a permanência na Alemanha foi fundamental para a realização desta tese e me dá a certeza de que nossa amizade será eterna. À Vanete, agradeço também pelas sugestões na correção gramatical desta tese.

A todos os meus amigos, em especial às amigas Elke Mascarenhas, Oda Fortes e Paula Kussakawa, por eu poder ter a certeza de que a amizade não tem preço e de que, mesmo estando longe, estamos perto.

À minha família, que sempre esteve presente, acompanhando o período de realização deste trabalho e em todos os outros momentos importantes da minha vida.

A Deus, que guia os meus passos.

A todos os outros que participaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*Algo só é impossível até que alguém duvide e
acabe provando o contrário*

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	4
2.2 TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA	6
2.2.1 Preparo Para Realizar um Teste Cutâneo.....	6
2.2.2 Reações Adversas dos Testes Cutâneos.....	6
2.2.3 Técnica do Teste Cutâneo Por Puntura	6
2.2.4 Mecanismo do Teste Cutâneo por Puntura.....	8
2.2.5 Alguns Erros Comuns na Realização do Teste Cutâneo por Puntura.....	9
2.2.6 Variáveis que Afetam o Teste Cutâneo	9
2.2.6.1 Área do corpo.....	9
2.2.6.2 Idade	10
2.2.6.3 Gênero	10
2.2.6.4 Etnia	10
2.2.6.5 Ritmo circadiano.....	10
2.2.6.6 Variações sazonais	10
2.2.6.7 Condições patológicas	11
2.2.6.8 Drogas.....	11
2.2.6.9 Imunoterapia	12
2.2.7 Quando o Teste Cutâneo não Puder Ser Realizado	12
2.2.8 Leitura do Teste Cutâneo Por Puntura	12
2.2.8.1 Fotografia digital.....	17
2.2.8.2 Termometria cutânea de alta resolução	17

2.2.8.3	Scanner óptico 3D	18
2.2.9	Escolha de Anti-histamínicos Não-sedantes X Sedantes no Tratamento de Doenças Alérgicas.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	AÇÃO DOS ANTI-HISTAMÍNICOS SEDANTE E NÃO-SEDANTES NOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA, ANALISADA ATRAVÉS DO MÉTODO DA FOTOGRAFIA DIGITAL	22
3.1.1	Desenho	22
3.1.2	Sujeitos	22
3.1.3	Teste Clínico.....	23
3.1.4	Testes Cutâneos por Puntura.....	23
3.1.5	Avaliação do Teste Cutâneo por Puntura.....	23
3.1.5.1	Determinação da área da pápula pela fotografia digital	24
3.1.5.2	Determinação da área do eritema pela fotografia digital.....	24
3.1.6	Análise Estatística	25
3.2	ANÁLISE POR IMAGEM TRIDIMENSIONAL DAS REAÇÕES INDUZIDAS PELOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA	26
3.2.1	Desenho	26
3.2.2	Sujeitos	26
3.2.3	Captura da Imagem Tridimensional.....	26
3.2.4	Teste de Reprodutibilidade.....	27
3.2.4.1	<i>In vitro</i>	27
3.2.4.2	<i>In vivo</i>	28
3.2.5	Teste de Acurácia.....	28
3.2.6	Análise Estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	AÇÃO DOS ANTI-HISTAMÍNICOS SEDANTE E NÃO-SEDANTES NOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA, ANALISADA ATRAVÉS DO MÉTODO DA FOTOGRAFIA DIGITAL	30
4.2	ANÁLISE POR IMAGEM TRIDIMENSIONAL DAS REAÇÕES INDUZIDAS PELOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA	32

4.2.1	Analisando a Reprodutibilidade do Método de Imagem Tridimensional.....	33
4.2.1.1	Análises das imagens 3D da figura (<i>in vitro</i>).....	33
4.2.1.2	Análises das imagens 3D da reação cutânea (<i>in vivo</i>)	33
4.2.2	Avaliando a Reprodutibilidade do Método da Medida do Diâmetro (<i>In Vivo</i>)	34
4.2.3	Avaliação da Acurácia	34
4.2.4	Calibração.....	35
4.2.5	Curva ROC	35
5	DISCUSSÃO	36
5.1	AÇÃO DOS ANTI-HISTAMÍNICOS SEDANTE E NÃO-SEDANTES NOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA, ANALISADA ATRAVÉS DO MÉTODO DA FOTOGRAFIA DIGITAL	36
5.2	ANÁLISE POR IMAGEM TRIDIMENSIONAL DAS REAÇÕES INDUZIDAS PELOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA	37
6	CONCLUSÃO	40
6.1	COMENTÁRIOS FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO 1 - DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS	48
	ANEXO 2 - ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE	52

LISTA DE TABELAS

1	TESTES NEGATIVOS AO ALÉRGENO APÓS ANTI-HISTAMÍNICOS NÚMERO DOS SUJEITOS QUE APRESENTARAM TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA NEGATIVO AO <i>D. PTERONYSSINUS</i> APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DOS ANTI-HISTAMÍNICOS	32
2	VALORES DAS MEDIDAS <i>IN VITRO</i> MÉDIA DOS VALORES DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA VOLUME, ÁREA E ALTURA, DAS MEDIDAS REPETIDAS <i>IN VITRO</i>	33
3	REPRODUTIBILIDADE, <i>IN VIVO</i> , DA IMAGEM 3D EXPRESSA PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV), DOS PARÂMETROS 3D, <i>IN VIVO</i> , NO 5.º, 10.º, 15.º E 20.º MINUTO PÓS-PUNTURA	33
4	REPRODUTIBILIDADE, <i>IN VIVO</i> , DO MÉTODO DO DIÂMETRO EXPRESSA PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV), DO MÉTODO DO DIÂMETRO, <i>IN VIVO</i> , NO 5.º, 10.º, 15.º E 20.º MINUTO PÓS-PUNTURA.....	34
5	REPRODUTIBILIDADE EXPRESSA PELO r^2 <i>ADJUST</i> CALCULADO POR REGRESSÃO SIMPLES, PARA CADA TEMPO DE ANÁLISE, DOS MÉTODOS 3D E DIÂMETRO	34
6	ACURÁCIA EXPRESSA PELO r^2 <i>ADJUST</i> CALCULADO POR REGRESSÃO POLINOMIAL NO TEMPO TOTAL DE ANÁLISE	35

LISTA DE FIGURAS

1	APLICAÇÃO DOS EXTRATOS NA SUPERFÍCIE ANTERIOR DO ANTEBRAÇO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE POR PUNTURA.....	7
2	MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA PELO MASTÓCITO. LIGAÇÃO DE ANTÍGENOS À IgE.....	8
3	PÁPULA E ERITEMA INDUZIDOS PELA HISTAMINA, NO 10º MIN APÓS O TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA.....	9
4	LEITURA REPRESENTATIVA DA PÁPULA INDUZIDA PELO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA, PELA RÉGUA.....	13
5	ÁREA PELO SCANNER: CONTORNO MANUAL DA PÁPULA E DO ERITEMA INDUZIDOS PELA HISTAMINA, NO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA, DESENHADOS EM UMA FITA ADESIVA. CÍRCULO COMO REFERÊNCIA DE TAMANHO.....	14
6	FOTOGRAFIA DIGITAL DA REAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR HISTAMINA E ALERGENO, APÓS TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA, NO ANTEBRAÇO. ADESIVOS AO REDOR COMO REFERÊNCIAS DE TAMANHO E CORES.....	15
7	TERMOMETRIA CUTÂNEA: AUMENTO DA TEMPERATURA NO LOCAL DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA. REAÇÃO INDUZIDA POR ALERGENO, NA SUPERFÍCIE ANTERIOR DO ANTEBRAÇO.....	16
8	GMF PRIMOS PORTÁTIL. IMAGENS ARMAZENADAS NO COMPUTADOR APLICANDO O SOFTWARE <i>PRIMOS</i>	19
9	ALINHAMENTO DE DUAS IMAGENS DA MESMA LESÃO DE PELE, EM TEMPOS DIFERENTES.....	20
10	FILTROS PARA CONTORNO DA PÁPULA.....	24
11	FOTOGRAFIA DIGITAL AO 10.º MINUTO PÓS-PUNTURA. ÁREA SELECIONADA DO LOCAL DA PUNTURA UTILIZANDO A HISTAMINA.....	25
12	IMAGEM TRIDIMENSIONAL (3D) DA PÁPULA INDUZIDA NO DÉCIMO MINUTO APÓS PUNTURA.....	26
13	IMAGEM NO SOFTWARE <i>GMF</i> : PÁPULA PELO ALÉRGENO IMAGEM ARMAZENADA PELO SOFTWARE <i>GMF PRIMOS 5.075 D®</i> . PÁPULA INDUZIDA PELO ALÉRGENO, NO 10.º MIN PÓS-PUNTURA.....	27
14	SUPRESSÃO DAS REAÇÕES CUTÂNEAS, INDUZIDAS POR HISTAMINA NOS VOLUNTÁRIOS TRATADOS, PELOS ANTI-HISTAMÍNICOS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	- Tridimensional
AHns	- Anti-histamínicos não-sedantes
Ahs	- Anti-histamínico sedante
ANOVA	- Análise da Variância
CCD	- <i>Charge Coupled Device</i>
CLIA	- <i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i>
CV	- Coeficiente de variação
DM	- Diâmetro médio pela régua
FC	- Fragmento cristalizável
FD	- Fotografia digital
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
IgE	- Imunoglobulina E
IL-4	- Interleucina 4
JPEG	- <i>Joint Pictures Expert Group</i>
RA	- Rinite alérgica
RAST	- <i>Radioallergosorbent test</i>
SD	- Desvio padrão
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCP	- Teste cutâneo por puntura
UC	- Urticária crônica

RESUMO

Introdução: Métodos objetivos de avaliação da reação cutânea a histamina ou extratos alergênicos são importantes para reduzir a subjetividade e permitir a padronização de avaliações mundiais. Tais métodos podem ser usados para medir, de maneira precisa e comparativa, a eficiência de anti-histamínicos. Além disso, parâmetros ainda não estudados podem ser incorporados às medidas tradicionais de avaliação do teste cutâneo por puntura.

Objetivo: Comparar a ação de anti-histamínicos, sedante (AHs) e não-sedantes (AHns), nas reações induzidas pelo teste cutâneo por puntura, utilizando a técnica da fotografia digital, e avaliar a reprodutibilidade e acurácia de um novo método de leitura deste teste por meio de imagens tridimensionais.

Métodos: Os testes cutâneos por puntura foram feitos com extratos de *D. pteronyssinus*, histamina e solução salina. Para análise dos efeitos dos anti-histamínicos nos testes pela fotografia digital, realizou-se estudo caso-controle, randomizado. Os testes foram realizados em 75 voluntários pré e pós-administração de dose única, via oral, de 25mg de hidroxizina, 5 mg de desloratadina, 20mg de epinastina, 120mg de fexofenadina ou placebo. Os testes foram avaliados 10 minutos após a puntura por fotografia digital e por método do diâmetro médio. Para análise tridimensional (3D) do teste, uma figura de área conhecida foi medida 10 vezes por dois observadores. Os testes por puntura foram realizados em 10 voluntários e as imagens 3D do local dos testes foram obtidas nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 min, após a puntura, por dois observadores, usando o sistema PRIMOS 5.075 D. Em todos os tempos de leitura dos testes, realizou-se também o método do diâmetro médio.

Resultados: AHns preveniram o desenvolvimento de reações positivas à histamina somente em 10-20% de todos os sujeitos testados. Em contrapartida, mais de 50% dos que utilizaram hidroxizina apresentaram o teste negativo. Resultados estes semelhantes ao obtidos pelo método do diâmetro médio. Pequena variabilidade inter e intra-observador foi encontrada na avaliação da pápula pela imagem 3D. Logo, o sistema se mostrou reprodutível. Os resultados também demonstraram ser um método preciso ($r^2=0,93$ para avaliação da área da pápula). **Conclusões:** Os resultados aqui descritos mostram o potencial de evolução de técnicas úteis na determinação da reação cutânea mediada pela histamina. Tais resultados podem ser úteis para avaliação da efetividade de drogas nessas reações.

Palavras-chave: Anti-histamínicos, teste cutâneo por puntura, análise de imagens, imagem tridimensional.

ABSTRACT

Background: Objective methods of evaluation of skin prick tests performed using histamine or allergens are important to reduce the subjectivity and to allow the standardization of world-wide evaluations. Such methods can be used to measure the efficacy of antihistamines with high reproducibility and precision. In addition, new parameters can be incorporated in the traditional measures of evaluation of skin prick test. **Objectives:** To compare the effect of sedating (AHs) and non-sedating (AHns) antihistamines using digital photography, and to assess the reproducibility and accuracy of a new three-dimensional (3D) imaging system for skin reaction induced by prick test. **Methods:** Skin prick tests with histamine and *D. pteronyssinus* extract were performed. This study was double-blind, randomized to assess the effect of antihistamines using digital photography. Seventy-five volunteers were underwent to skin prick test, before and 4 h after treatment with hydroxyzine 25mg, desloratadine 5mg, epinastine 20 mg, fexofenadine 120mg, or placebo. The reaction development was assessed by digital photography and mean diameter. For 3D analysis of the reaction, a figure with known area was measured ten times by two observers. The skin prick test was performed in ten volunteers and the 3D images obtained at 0, 5, 10, 15 and 20 min after prick by two observers using PRIMOS 5.075 D system. The two observers also performed the mean diameter in each point of analysis. **Results:** AHns prevented the development of positive reactions to histamine in only 10-20% of all subjects tested. In contrary, more than 50% of all hydroxyzine-treated subjects showed negative test reactions. Similar results were detected by mean diameter. A low inter- and intra-observer variability was observed for the 3D imaging evaluation of figure and of skin prick test reactions. With the 3D imaging analysis system, reproducibility was achieved. Moreover, results were accurate ($r^2=0.93$ for wheal size evaluation). **Conclusions:** The results show the potential of evolution of useful techniques in the determination of the skin reactions mediated by histamine. The methods can be useful for evaluation of effectiveness of drugs in these reactions.

Key-words: Antihistamines, skin prick test, image analysis, three-dimensional imaging.

1 INTRODUÇÃO

Os sinais cardinais inflamatórios são dor, rubor, edema e calor. Na metade do século XIX Virchow acrescentou “perda da função” aos sinais inflamatórios (PLYTYCZ e SELJELID, 2003). A reação cutânea induzida pelo teste cutâneo por puntura (TCP) mostra características de inflamação. Por isso e por apresentar alta sensibilidade, baixo custo, simplicidade na realização e resultado imediato, é o teste padrão para diagnósticos de doenças alérgicas tipo I (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

No TCP é utilizado histamina e extrato alérgico para indução da reação cutânea, através de puntura com agulha ou lanceta. A histamina é o controle positivo do teste e usado para simular uma reação alérgica, atua diretamente nos componentes da pele causando vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e edema (pápula). No teste cutâneo com extrato alérgico, em sujeitos sensibilizados, a histamina produzida e estocada nos mastócitos, e outros mediadores pré-formados, são liberados (SERAFIN e AUSREN, 1987). As fibras-c também são estimuladas, o que induz a um reflexo axonal (eritema), com liberação de neuropeptídeos, provavelmente os componentes principais na pápula e no eritema induzidos por alérgico no TCP (HÄGERMANRK, HÖKFELT e PERNOW, 1978).

Os resultados do TCP são baseados no tamanho da pápula e têm um grande impacto nas decisões clínicas (BERNSTEIN e STORMS, 1995). Resultados positivos podem indicar a causa provável de uma hipersensibilidade a insetos, alimentos ou drogas com risco de vida, ou de doenças alérgicas causadas por aeroalérgicos. Além disso, a indicação e a eficácia terapêutica da imunoterapia são baseadas no TCP (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

Os testes clínicos, como o TCP, são aceitos quando o teste apresenta uma metodologia bem definida e validada, e seus resultados sob os regulamentos derivados do *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) de 1988, como acurácia, precisão e documentação dos resultados. O respeito às normas na realização e na

interpretação do TCP é necessária para a própria padronização do extrato alérgeno pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (CLIA).

Não existe um sistema mundialmente aceito de documentação e interpretação dos testes cutâneos por puntura e por isso vários métodos são utilizados. O método considerado preciso, mais realizado em estudos clínicos para quantificar o tamanho da pápula e do eritema induzidos pelo TCP, baseia-se em imagens obtidas dos contornos da pápula, desenhados com caneta em fita adesiva transparente, transferidos para um sistema digital por *scanner* (PIJNENBORG, NILSSON e DREBORG, 1996). Embora seja um método altamente reprodutível e confiável, o contorno da pápula é feito a olho nu e precisa de análise manual da imagem. Quando o método de leitura é subjetivo, a interpretação pode não ser a mesma, dependendo das diferentes pessoas e locais.

Foi desenvolvido um método semi-automatizado de interpretação do TCP usando fotografias digitais, que permite análise objetiva da pápula e documentação icnográfica ou científica (VIEIRA DOS SANTOS, TITUS e CAVALCANTE LIMA, 2007). Apesar de ser objetivo, não foi testado em estudo clínico e precisa ser automatizado.

Estudos sobre o TCP geralmente não contemplam todas as variáveis nas análises da reação induzida. Embora o tamanho da pápula seja o principal indicador da intensidade da reação, variações individuais são observadas, entre as quais a presença de eritema sem pápula e vice-versa, cujo significado é pouco compreendido. O método da fotografia digital, além de avaliar o tamanho da pápula, quantifica o tamanho e a intensidade do eritema, mesmo em indivíduos melanodérmicos, possibilitando o melhor entendimento da relação pápula-eritema induzidos por alérgenos e, por conseguinte, a fisiopatologia (VIEIRA DOS SANTOS e CAVALCANTE LIMA, 2007).

Dos sinais cardinais da inflamação no TCP, a temperatura é o parâmetro menos estudado, talvez pela dificuldade técnica para realização de estudos precisos e acesso à aparelhagem apropriada. Finalmente, a intensidade do prurido (dor) é dependente da subjetividade do paciente.

Foi evidenciada a cinética de três sinais inflamatórios (edema, rubor e calor) da reação induzida pelo TCP, relacionada entre si *in vivo*, pela análise de fotografia

digital e termometria cutânea (VIEIRA DOS SANTOS e CAVALCANTE LIMA, 2007). Através dessa metodologia, foi possível a mensuração da reação tríplice de Lewis pela intensidade e cinética de desenvolvimento. Além disso, adicionou variáveis que podem ser medidas em conjunto sob outras condições experimentais.

O mais novo método na medicina para avaliar a superfície cutânea é através da imagem tridimensional (3D). Já muito utilizado na ortodontia e nos planejamentos cirúrgicos, a superfície da pele pode ser medida rapidamente por um método não-invasivo e com maior acurácia (LOUKAS et al., 2006; HAJEER et al., 2005). Entretanto, não há estudos da interpretação do TCP por este método.

1.1 OBJETIVOS

1. Avaliar a eficácia do efeito supressor dos anti-histamínicos não sedantes (desloratadina, epinastina, e fexofenadina) com um sedante, a hidroxizina, na formação da pápula e do eritema induzidos por histamina ou alérgeno, por meio do teste cutâneo por puntura, através do método da fotografia digital:
2. Avaliar um novo método de leitura dos testes cutâneos por puntura através do método de imagem tridimensional.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Muitas substâncias causam inflamação quando introduzidas na pele. Alguns compostos causam reação inflamatória local em todos os indivíduos expostos e geralmente são chamados de irritantes ou tóxicos. Aquelas reações que ocorrem com base em resposta imune específica são chamadas de reações de hipersensibilidade àquele antígeno. As doenças alérgicas mediadas por IgE são por reação de hipersensibilidade imediata ou do tipo I (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

Em países desenvolvidos, 30 a 40% da população é atópica, com uma proporção de doença alérgica, por exemplo, para asma, de 5 a 10%, rinite de 10 a 20% e alergia alimentar de 1 a 3%. Atopia refere-se a hiperresponsividade da IgE e representa a predisposição à doença alérgica. Alergia refere-se à expressão clínica da doença atópica mediada por IgE (HOLGATE, CHURCH e LAWRENCE, 2000).

As reações alérgicas exigem uma exposição prévia ao alérgeno. A primeira exposição a um determinado alérgeno ou antígeno induz à produção de anticorpos IgE contra o antígeno em questão, guiados pela produção de IL-4 pelas células T auxiliares. A IgE une-se aos mastócitos via porção FC. Os precursores dos mastócitos migram para os tecidos, onde se tornam mastócitos maduros, com localização predominante próxima aos vasos sanguíneos e nervos abaixo dos epitélios. Uma vez que uma quantidade suficiente de anticorpo IgE está presente nos mastócitos, a re-exposição ao mesmo antígeno induz sua ativação, pela ligação cruzada do antígeno com as moléculas de anticorpo IgE, causando a liberação de mediadores inflamatórios no tecido circundante, como histamina e triptase. Outros mediadores, como prostaglandina D₂, leucotrienos C e D, estão envolvidos nesta reação, mas a histamina é a principal (FOREMAN, 1987).

O diagnóstico de uma doença alérgica do tipo I deve basear-se na história clínica, no exame físico do paciente e na determinação de anticorpos IgE específicos. O teste cutâneo só tem valor diagnóstico quando interpretado no contexto clínico do paciente, pois indivíduos assintomáticos também podem apresentar resultados positivos (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

Há dois tipos de teste cutâneo para a detecção do IgE: o teste por puntura (também chamado de teste cutâneo de leitura imediata, teste epicutâneo ou *prick test*) e o intradérmico (ou intracutâneo). O teste intradérmico é realizado em ocasiões especiais e o teste cutâneo por puntura (TCP) é o mais empregado por ser rápido, barato, sensível e específico (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

A reação cutânea induzida pelo TCP apresenta características de inflamação. Observa-se, inicialmente, uma reatividade vascular (eritema) após a introdução de histamina ou alérgeno na pele, seguida de vasodilatação reflexa ao redor do local da inoculação, e da formação de edema por extravasamento de líquido. Essa seqüência caracteriza a reação tríplice de Lewis, que, no final do processo, resulta em aumento da temperatura e edema local (pápula), em eritema reflexo ao redor da pápula e prurido. Tudo isso, em conjunto, forma os sinais cardinais da inflamação (PLYTYCZ e SELJELID, 2003; LEWIS, 1927).

O TCP teve sua primeira aplicação prática para detecção clínica da hipersensibilidade do tipo I no ano de 1912 (SCHLOSS, 1912), mas se tornou popular em 1970, após ser modificado por Pepys (PEPYS, 1975). É recomendado como teste inicial para investigação de doença alérgica mediada por IgE. Além da sua importância clínica, é indispensável para padronização dos extratos alérgenos e para estudos dos mecanismos alérgico, inflamatório e farmacológico (TRIPATHI e PATTERSON, 2001; CLIA, 2007; FOREMAN, 1987; PUROHIT et al., 2003).

2.2 TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA

2.2.1 Preparo Para Realizar um Teste Cutâneo

Antes de iniciar qualquer teste cutâneo, deve-se ter algumas precauções: deve ser realizado se houver um médico disponível para atender reações sistêmicas, ter equipamento de emergência rapidamente disponível; ser cuidadoso com os pacientes que já tiveram reações sistêmicas; determinar a validade e a estabilidade do extrato alergênico a ser usado; incluir controle positivo e negativo; realizar o teste em pele normal; avaliar o paciente para dermatografismo; investigar quais as medicações em uso pelo paciente e o tempo transcorrido desde a última dose (DOLEN, 2001).

2.2.2 Reações Adversas dos Testes Cutâneos

Embora complicações oriundas do teste cutâneo sejam infreqüentes, podem ocorrer, especialmente pelo intradérmico. As reações locais são mais freqüentes e geralmente envolvem com aplicação de compressas frias e administração de anti-histamínicos via oral. O TCP, utilizando aeroalérgenos, é seguro e nenhum caso de fatalidade é conhecido (DOLEN, 2001).

2.2.3 Técnica do Teste Cutâneo Por Puntura

O TCP é realizado colocando uma pequena gota de cada extrato a ser testado, incluindo as soluções de controle negativo (solução salina) e positivo (histamina), na superfície anterior do antebraço. As gotas devem ser colocadas com 2cm ou mais de distância entre elas (figura 1) (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

FIGURA 1 - APLICAÇÃO DOS EXTRATOS NA SUPERFÍCIE ANTERIOR DO ANTEBRAÇO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE POR PUNTURA



FONTE: www.separ.es/pacientes/imagenes/rinitis1.jpg

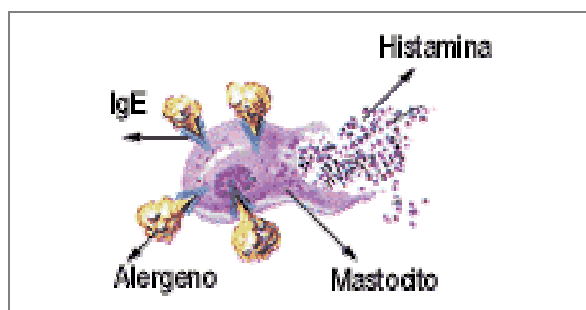
Uma agulha descartável 26-G é passada através da gota e inserida dentro da superfície epidérmica em ângulo de 45°. A ponta da agulha é delicadamente levantada para elevar uma pequena porção da epiderme sem induzir sangramento. A agulha é então retirada e a solução removida (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

Há outras técnicas para o TCP e as opiniões sobre estas técnicas variam de acordo com a habilidade, a experiência e a preferência de quem o realiza (OSTERBALLE e WEEKE, 1979; NELSON et al., 1993). Os extratos escolhidos para realizar o teste são baseados na idade, na história e na exposição alérgica do paciente, e no local onde o paciente mora. Os extratos mais utilizados são de aeroalérgenos. O TCP usando extratos de veneno de vespa, abelha ou formiga, é considerado o método mais sensível e específico para confirmar anticorpos IgE específicos nos pacientes com história prévia de reação à picada de insetos. Poucos extratos são de alimentos, ou outros alérgenos, pela falta de qualidade ou de padronização. Em algumas situações pode ser feito o *prick-to-prick*, que consiste em realizar uma punção com agulha em uma fruta, por exemplo, e, com a mesma agulha, uma punção na pele (FINEMAN et al., 1995).

2.2.4 Mecanismo do Teste Cutâneo por Puntura

O antígeno, introduzido na pele, dá início a uma resposta de hipersensibilidade imediata em um indivíduo sensibilizado, que é a ligação do antígeno à IgE na superfície dos mastócitos ou basófilos. Essas células são ativadas por ligação cruzada de moléculas pré-fixadas à superfície da IgE, induzindo a liberação de mediadores, particularmente a histamina (figura 2).

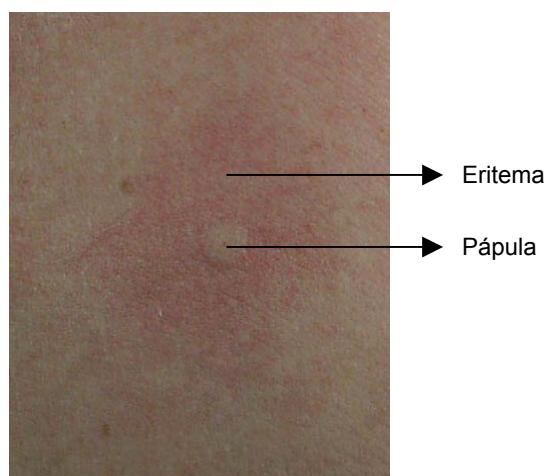
FIGURA 2 - MECANISMO DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA PELO MASTÓCITO. LIGAÇÃO DE ANTÍGENOS À IGE



FONTE: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c32.htm>

A histamina é um agonista H1 e H2 endógeno que pela ação H1 mobiliza cálcio e, pela H2, estimula a adenilciclase nos neurônios, levando à vasodilatação que caracteriza o eritema. Este, por sua vez, é substituído por um edema mole resultante do extravasamento de plasma, o que forma a pápula (figura 3). A histamina induzindo reações cutâneas no TCP simula uma reação como a causada pelo alérgeno, mas não é idêntica, e sua fisiopatologia não é completamente conhecida (FOREMAN, 1987).

FIGURA 3 - PÁPULA E ERITEMA INDUZIDOS PELA HISTAMINA, NO 10^o MIN APÓS O TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA



FONTE: A autora

A reação imediata pode ser seguida pela reação tardia, com pico entre 6 a 12 horas que se resolve em aproximadamente 24 a 48 horas e é representada por uma reação inflamatória eritematosa local (FREW e KAY, 1988).

2.2.5 Alguns Erros Comuns na Realização do Teste Cutâneo por Puntura

Alguns erros comuns na realização do TCP incluem: colocação dos extratos de alérgenos muito próximos, a menos de 2cm, impossibilitando a individualização das reações; indução de sangramento, pela possibilidade de falso positivo; penetração insuficiente de material na pele, levando a falso negativo (mais comuns com outros dispositivos que não a agulha); mistura de soluções alérgenas durante a realização do teste ou quando da sua remoção (DOLEN, 2001).

2.2.6 Variáveis que Afetam o Teste Cutâneo

2.2.6.1 Área do corpo

A região superior do dorso é mais reativa que a região anterior do antebraço. A fossa antecubital é a porção mais reativa do braço e a região do punho a menos

reativa. Pela praticidade, o teste é feito no terço médio do antebraço, na face anterior (NELSON, KNOETZER e BUCHER, 1996).

2.2.6.2 Idade

Lactentes reagem, predominantemente, com eritema maior e pápula menor. A maioria dos lactentes acima dos 3 meses de idade reage à histamina com pápula significativamente maior que os lactentes abaixo dessa idade (BARBEE et al., 1981; SKASSA-BROCIEK et al., 1987).

2.2.6.3 Gênero

Não há diferença na reatividade ao teste entre homens e mulheres. Apesar da fase do ciclo menstrual alterar o tamanho da pápula de histamina, não tem significância clínica (KALOGEROMITROS et al., 1995).

2.2.6.4 Etnia

As pápulas induzidas por histamina são maiores em indivíduos negros do que em brancos, e a avaliação do eritema é mais difícil de ser realizada em indivíduos negros (JOSEPH et al., 2004).

2.2.6.5 Ritmo circadiano

A influência do ritmo circadiano é mínima e não afeta a interpretação do TCP (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

2.2.6.6 Variações sazonais

O teste para IgE específico para pólen deve ser feito na estação do pólen, já que a sensibilidade da pele pode diminuir fora desta estação (HAAHTELA e JOKELA, 1980).

2.2.6.7 Condições patológicas

O TCP não deve ser realizado em área de eczema ou qualquer lesão de pele (TRIPATHI e PATTERSON, 2001) para evitar falso-positivo. Os pacientes com insuficiência renal crônica, e/ou em hemodiálise, geralmente apresentam uma diminuição da reatividade da pele (BOUSQUET et al., 1988), podendo ocorrer teste falso-negativo. Alguns pacientes com câncer têm reatividade cutânea diminuída mais no eritema que na pápula (BOUSQUET et al., 1991), o que pode dificultar a leitura do teste. Injúrias na coluna espinhal ou nervos periféricos bloqueiam o eritema oriundo do reflexo axonal. Em caso prévio de reação anafilática, deve-se esperar pelo menos uma semana para realização do teste pela depleção dos mediadores inflamatórios nos grânulos dos mastócitos (TRIPATHI e PATTERSON, 2001).

2.2.6.8 Drogas

Os anti-histamínicos, antagonistas H1, inibem a formação da pápula e do eritema e a duração da inibição depende da farmacocinética do medicamento. Por exemplo, os anti-histamínicos não-sedantes podem suprimir a reação de 3 a 10 dias após o seu uso (PUROHIT et al., 2003). Os antagonistas H2 (por exemplo, a cimetidina) podem alterar o TCP se em associação com os H1. Orienta-se a suspender seu uso apenas no dia do teste (MILLER e NELSON, 1989).

Os antidepressivos tricíclicos e antieméticos podem diminuir a reatividade cutânea se usados a longo prazo. Nesses casos, é aconselhável suspender a medicação por uma semana antes da realização do TCP (RAO et al., 1988).

A utilização de corticóides por via oral a longo prazo pode afetar o resultado do teste cutâneo, dependendo da dose. Roches e colaboradores observaram que a reatividade cutânea não foi afetada em asmáticos que há dois anos utilizavam dose diária de 20mg. A aplicação de corticóides tópicos podem alterar o TCP e não devem ser aplicados no local do teste por pelo menos uma semana antes da sua realização (NELSON, 2001).

O uso de teofilina altera muito pouco o TCP e não é necessária a sua suspensão para a realização do teste (FINE et al., 1980).

Os agentes β -adrenérgicos, administrados por via oral, interferem pouco e de forma não significativa na realização do teste (SPECTOR, 1978). Já os bloqueadores β 2-adrenérgicos, como o propranolol, inibidor da enzima conversora da angiotensina e da monoaminoxidase, podem aumentar significativamente a reatividade cutânea (ANDERSON e DESHAZO, 1990). Os pacientes que usam essas medicações devem ter cuidados particulares ao realizar o teste cutâneo, pelo risco aumentado de reações sistêmicas, principalmente quando o teste for intradérmico.

2.2.6.9 Imunoterapia

A imunoterapia pode diminuir a reatividade cutânea nos indivíduos na fase de manutenção (GARCIA-ORTEGA et al., 1993).

2.2.7 Quando o Teste Cutâneo não Puder Ser Realizado

Nos indivíduos em que o teste cutâneo não pode ser realizado, pode-se determinar a IgE específica no soro. O teste mais conhecido é o RAST (*radioallergosorbent test*). O RAST não é afetado pelo uso de drogas nem por doença cutânea, é completamente seguro e podem ser testados tantos alérgenos quanto forem necessários (WOOD et al., 1999). Comparando-o com o TCP, este último é mais barato, o resultado é imediato, tem valor educacional e geralmente é mais sensível e específico.

2.2.8 Leitura do Teste Cutâneo Por Puntura

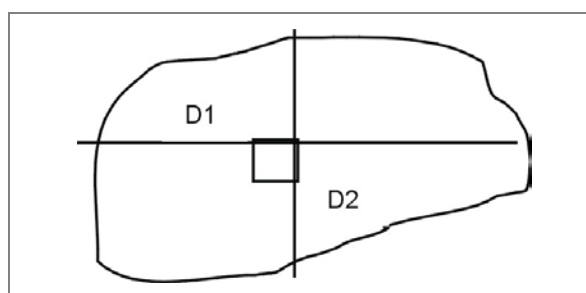
O resultado do teste é baseado principalmente no tamanho da pápula. Alguns autores consideram também o eritema na determinação da reatividade cutânea ao antígeno (BERNSTEIN e STORMS, 1995; NELSON et al., 1993). O pico máximo do tamanho da pápula induzida pela administração de histamina ocorre em

10 a 15 minutos após a puntura e do aeroalérgeno pode ocorrer até 30 minutos após sua aplicação (NELSON, KNOETZER e BUCHER 1996). Recomenda-se a interpretação do teste 15 minutos após puntura, embora a reação já esteja definida como positiva ou negativa ao 10.º minuto.

Há vários métodos de leitura do TCP. Um deles é pela comparação visual da área da pápula induzida por um antígeno com aquela induzida por histamina. O resultado é graduado de zero a 4+ (0: nenhuma reação ou reação sem diferença da pápula pelo controle negativo; 1+: eritema menor que 21 mm e maior que o controle negativo controle; 2+: eritema maior que 21 mm; 3+: eritema e pápula sem pseudópodes; 4+: eritema e pápula com pseudópodes) (DOAN e ZEISS, 1993). Este método é semiquantitativo, não muito utilizado e, por não ser preciso, não é recomendado para estudos clínicos. O método do diâmetro médio é o mais utilizado na rotina clínica, por ser mais conveniente.

Através de uma régua transparente milimetrada, é calculado o diâmetro médio das medidas do diâmetro mais longo (D1) da pápula e do menor diâmetro (D2) perpendicular e central a ele (diâmetro médio = $(D1+D2) / 2$) (figura 4). É considerado positivo quando o tamanho da pápula é ≥ 3 mm de diâmetro (AAS, 1975). Embora freqüentemente utilizado, é um método subjetivo e o coeficiente de variação tem sido descrito de 7 a 80% em diferentes centros (DREBORG et al., 1987; EICHLER et al, 1988; VOHLONEN et al., 1989).

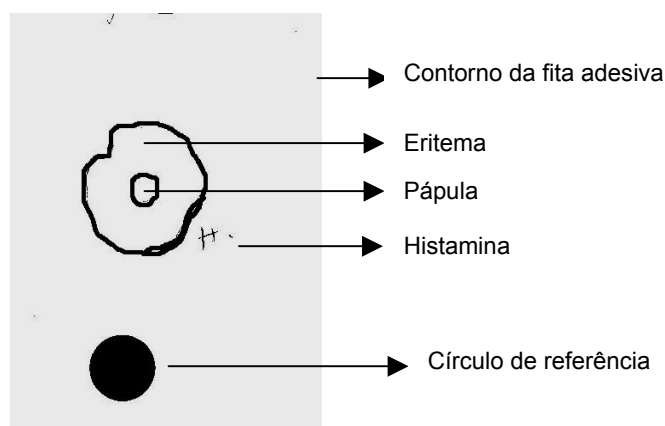
FIGURA 4 - LEITURA REPRESENTATIVA DA PÁPULA INDUZIDA PELO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA, PELA RÉGUA



FONTE: A autora

O método considerado preciso, e mais usado nos estudos clínicos, para avaliação do TCP, é por meio da determinação da área da pápula pela transferência do seu contorno, desenhado com uma caneta em fita transparente para um sistema digital por *scanner* (figura 5) e a área da pápula é calculada por um software. É considerado positivo quando o tamanho da pápula é $\geq 7\text{mm}^2$ (PIJNENBORG, NILSSON e DREBORG, 1996). Novo software foi desenvolvido para calcular a área da reação, com a vantagem de permitir o cálculo da pápula a partir de uma imagem processada por um sistema automático (WOHRL et al., 2006). Apesar de ser um método mais preciso que os convencionais, a imagem a ser analisada é criada a partir do contorno manual da pápula.

FIGURA 5 - ÁREA PELO SCANNER: CONTORNO MANUAL DA PÁPULA E DO ERITEMA INDUZIDOS PELA HISTAMINA, NO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA, DESENHADOS EM UMA FITA ADESIVA. CÍRCULO COMO REFERÊNCIA DE TAMANHO



FONTE: A autora

O método mais recentemente descrito para avaliação do TCP é através da fotografia digital (figura 6), aonde o contorno da pápula é obtido da imagem digitalizada através da aplicação de filtros disponíveis no software. Vantagens ainda desse método, em relação aos outros, estão na possibilidade de avaliar objetivamente o tamanho e a intensidade do eritema, e na documentação do teste (VIEIRA DOS SANTOS, TITUS e CAVALCANTE LIMA, 2007).

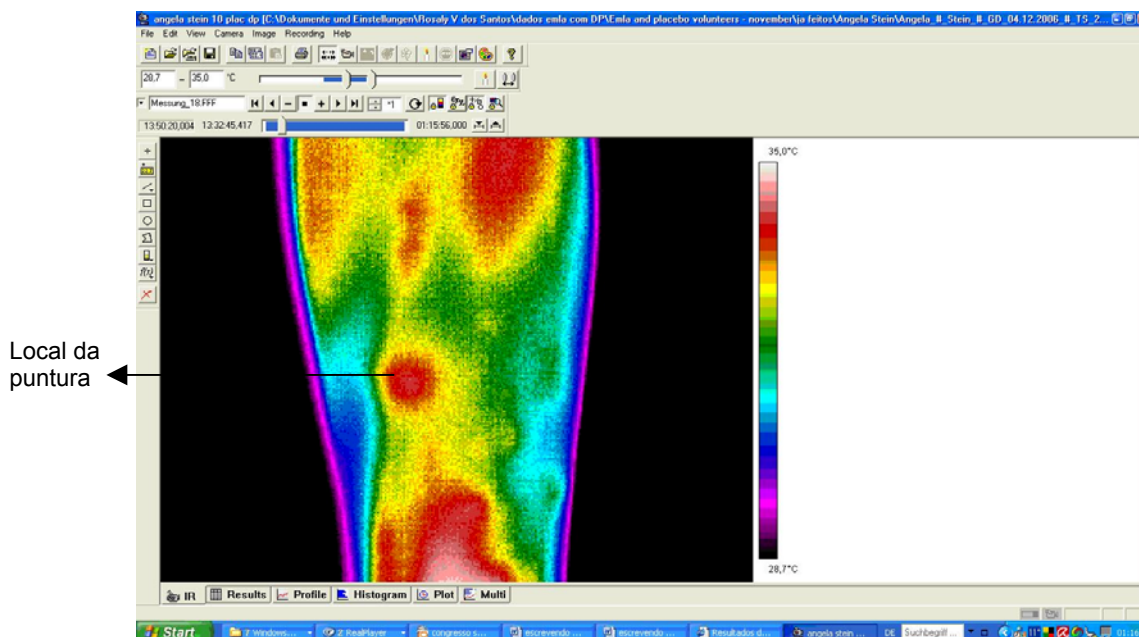
FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DIGITAL DA REAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA POR HISTAMINA E ALERGENO, APÓS TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA, NO ANTEBRAÇO. ADESIVOS AO REDOR COMO REFERÊNCIAS DE TAMANHO E CORES



FONTE: A autora

Também utilizando o mesmo método da fotografia digital, associado à termometria cutânea, foi demonstrada a cinética da reação cutânea induzida por histamina e alérgeno no TCP. A temperatura correlacionou-se significativamente, em todos os pontos da análise, com o tamanho da pápula (VIEIRA DOS SANTOS e CAVALCANTE LIMA, 2007) (figura 7), resultado este semelhante ao encontrado por Bagnato et al., correlacionando o aumento da temperatura, através da termometria infravermelha, no TCP, com o tamanho da pápula, avaliado pelo diâmetro médio (BAGNATO et al., 1997). Embora tenha se demonstrado a objetividade do método da fotografia digital, ele não foi utilizado em estudos clínicos, e precisa ser automatizado e padronizado. A termometria cutânea vem sendo lentamente utilizada no TCP e mais estudos são necessários para correlacionar os parâmetros analisados por este método, como a intensidade e a área da temperatura no local do teste, com a fisiopatologia da reação.

FIGURA 7 - TERMOMETRIA CUTÂNEA: AUMENTO DA TEMPERATURA NO LOCAL DO TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA. REAÇÃO INDUZIDA POR ALERGENO, NA SUPERFÍCIE ANTERIOR DO ANTEBRAÇO



FONTE: A autora

Recentes avanços na tecnologia computadorizada e maior conhecimento das análises de imagens tridimensionais, tem introduzido novos horizontes para a aplicação da imagem tridimensional em medicina. O método tridimensional é o método mais novo para avaliar a superfície cutânea, sendo mais usado entre os dermatologistas, cirurgiões e ortodontistas (LOUKAS et al., 2006; HAJEER et al., 2005). Entretanto, não há estudos da interpretação do TCP por este método.

Doppler, microdiálise, entre outros estudos experimentais, têm sido descritos para a análise da reação inflamatória induzida pelo TCP (CLOUGH, BENNETT e CHURCH, 1998; OKAHARA et al., 1995).

A fotografia digital, a termometria cutânea de alta resolução e a imagem tridimensional são, assim, os métodos não-invasivos mais promissores quanto a acurácia e precisão na leitura do TCP.

2.2.8.1 Fotografia digital

A câmera digital consiste em uma máquina com corpo e lentes convencionais com CCD ou *Charge Coupled Device*, que ocupa o lugar do filme. O CCD é um *chip* de silicone composto por elementos individuais, ou *pixels*, que reage à luz como os filmes nas câmeras tradicionais e a transforma em voltagem. O microcomputador imbutido na câmera converte essa voltagem em dados binários. O CCD é insensível a cores, mas com um filtro vermelho, verde ou azul à sua frente, o *chip* digitaliza os componentes individuais das cores na imagem para reproduzir a representação colorida. O CCD é a unidade crítica da câmera; sua habilidade em reproduzir uma imagem digital é função de sua resolução, que pode ser definida como a densidade dos elementos fotossensíveis, ou *pixels*, que ela contém (SMITH, 2002; ATNER, THOMAS e BICKERS, 1999).

Documentação fotográfica médica:

A documentação fotográfica médica deve ser tecnicamente perfeita e fiel. Os objetos importantes e seus detalhes devem estar todos em foco, ou seja, nítidos. A imagem deve ser padronizada e reprodutível; para isso, deve-se antes padronizar e adequar a iluminação, a exposição e a profundidade de campo, o enquadramento e o fundo das fotos. A fotografia digital é bastante satisfatória nos quesitos qualidade e precisão, além de possibilitar a realização de análises colorimétricas computadorizadas e a quantificação objetiva dos resultados dos procedimentos.

2.2.8.2 Termometria cutânea de alta resolução

Os sistemas infravermelhos têm por objetivo transformar a radiação captada em informação térmica, que pode ser qualitativa ou quantitativa. A visão humana abrange a faixa espectral de comprimentos de onda entre 0,40 e 0,75 μm . A sensibilidade máxima ocorre entre 0,50 e 0,55 μm , dependendo do grau de adaptação dos olhos à luminosidade. Os recursos da fotografia infravermelha estendem-se até o comprimento de onda de 0,9 μm , além do qual a energia associada à radiação já não é suficiente

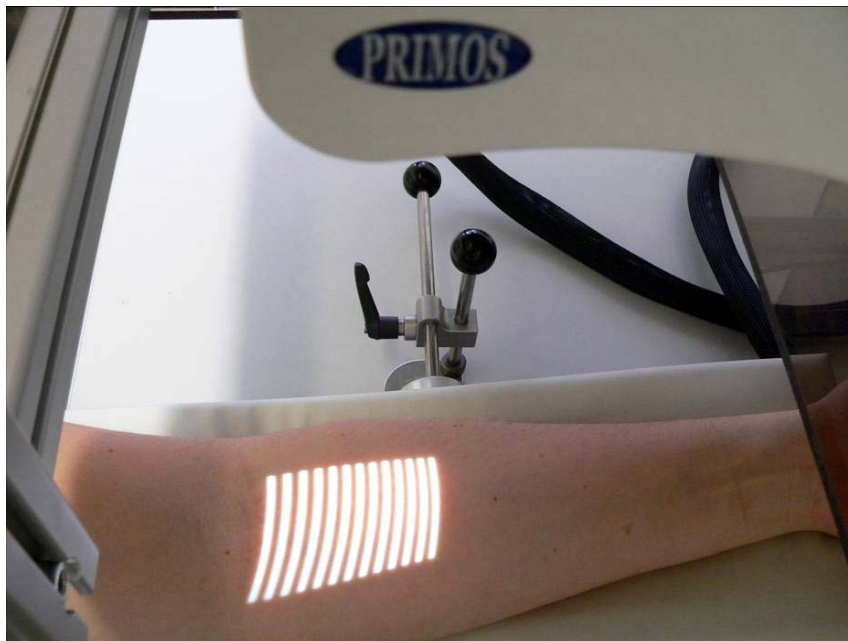
para sensibilizar emulsões fotográficas. Nessa faixa, a imagem registrada deve-se à radiação refletida a partir de alguma fonte externa, visto que a emissão própria de corpos com temperaturas menores que 250°C é muito pequena. A detecção de comprimentos de ondas mais longos é obtida com auxílio de equipamentos denominados sistemas infravermelhos, que convertem a radiação captada em sinais eletrônicos, possibilitando a formação de imagens térmicas e a medição de temperatura à distância. Os elementos básicos que compõem esse sistema são: óptica do sistema, mecanismo de varredura, detector, processador e *display*. Normalmente as imagens são formadas a partir da varredura bidimensional da cena; são apresentadas em tubos de raios catódicos, onde um feixe eletrônico varre a tela em sincronismo com os movimentos do mecanismo de varredura. O deslocamento do feixe produz linhas que formam a imagem, composta por uma sucessão de pontos denominados *pixels*. Para ter boa qualidade visual, a imagem deve incluir o maior número de *pixels*, e a frequência de varredura deve ser tal que não produza cintilação. As medições baseiam-se na comparação entre o sinal gerado no detector a partir de uma referência de temperatura e o sinal decorrente do corpo em medição (KAPLAN, 2000).

2.2.8.3 *Scanner* óptico 3D

Um *scanner* 3D é um aparelho que coleta dados de um objeto em sua forma e sua aparência. Há várias tecnologias para se obter uma imagem 3D. Cada tecnologia apresenta suas próprias limitações, vantagens e custos.

O aparelho GMF PRIMOS[®] portátil, um *scanner* óptico 3D, foi especialmente desenvolvido com intuito de medir a superfície da pele em tempo real. Pode ser utilizado fixo a um tripé ou segurado pelas mãos (figura 8).

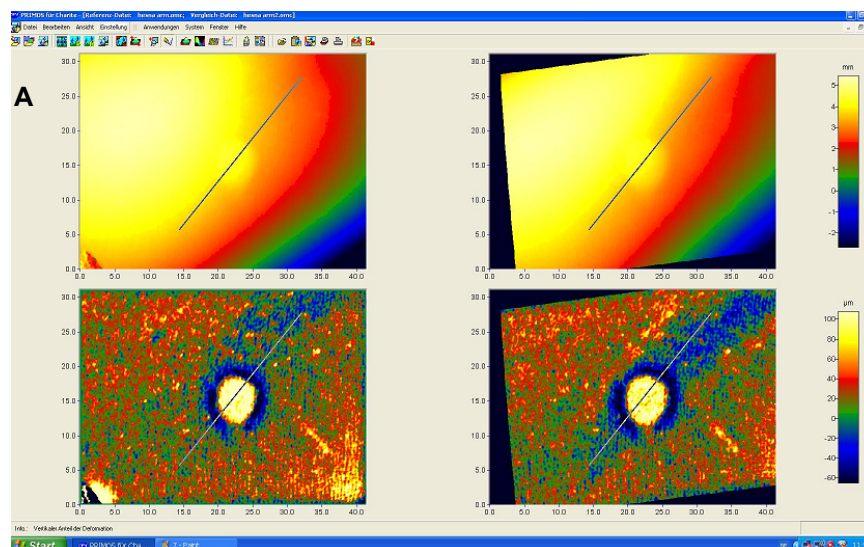
FIGURA 8 - GMF PRIMOS PORTÁTIL. IMAGENS ARMazenADAS NO COMPUTADOR APLICANDO O SOFTWARE *PRIMOS*



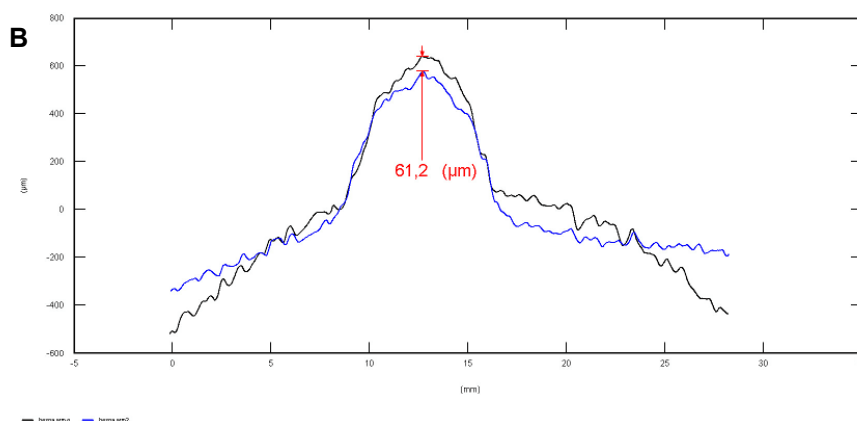
FONTE: A autora

Com este aparelho, a área de captura da imagem é de até 40mm². Listras paralelas são projetadas no objeto ou na pele. O desvio e a topografia dessas listras são capturados em linhas perfeitamente paralelas por uma câmera CCD e transformados em coordenadas X, Y e Z, utilizando mais de 310.000 pontos de medida para um único parâmetro 3D. O tempo de captura de uma imagem é muito curto (68ms) devido a um sistema de câmera CCD de 60 Hz. As imagens são armazenadas em um banco de dados e avaliadas através do software GMF 5.075D. Esse sistema permite medida automática e simultânea de todos os parâmetros 3D da superfície da pele, com variação de micrômetros na resolução da imagem, em todos os eixos, garantindo precisão em todos os parâmetros. Ainda, medições em tempos diferentes do mesmo local podem ser feitas e comparadas por alinhamentos de imagens, usando ferramentas do software (figura 9) (ROSÉN, BLUNT e THOMAS, 2005).

FIGURA 9 - ALINHAMENTO DE DUAS IMAGENS DA MESMA LESÃO DE PELE, EM TEMPOS DIFERENTES



Aplicando ferramentas do software *Primos 5.075 D* para alinhamento de duas imagens. Traço em linha reta no local a ser calculado.



Exemplo para cálculo de comparação das duas imagens.

FONTE: A autora

2.2.9 Escolha de Anti-histamínicos Não-sedantes X Sedantes no Tratamento de Doenças Alérgicas

Anti-histamínicos (AH) são drogas de primeira escolha no tratamento de doenças alérgicas como rinite alérgica (RA) e outras doenças mediadas por mastócitos como a urticária crônica (UC) e a mastocitose. Para o tratamento dessas doenças, recomenda-se o uso de anti-histamínicos não-sedantes (AHns) (ZUBERBIER et al., 2006). Essas recomendações são baseadas no fato dos AHns mostrarem-se efetivos no tratamento da RA, UC e mastocitoses (LEE et al., 2004; HANDA, DOGRA e KUMAR,

2004). Prefere-se os AHns que os sedantes (AHs) justamente pelo seu menor efeito de sedação (TASHIRO et al., 2005). Entretanto, AHs são ainda muito utilizados para o tratamento de doenças mediadas por histamina. Isso ocorre, provavelmente, devido a uma ou combinações de razões: a) AHs são geralmente mais baratos que os AHns, os quais não são reembolsados pelos seguros de saúde em diversos países (SULLIVAN e NICHOL, 2004). b) Pacientes e médicos são mais familiarizados com os AHs e, por isso, relutantes em compostos que não costumam prescrever (CIPHER, HOOKER e GUERRA 2006), c) A segurança dos AHs está bem caracterizada pelo seu uso há mais de 4 décadas (SPAETH, KLIMEK e MOSGES, 1996).

Os AHns são freqüentemente considerados mais eficazes quando comparados aos AHs. Isto tem sido aceito pelo fato de poucos estudos terem sido realizados mostrando a superioridade dos AHns sobre os AHs (MORGAN, KHAN e NATHAN, 2005, GREAVES, 2005; KALIVAS et al., 1990). A maioria dos estudos para avaliar a eficácia dos AH baseia-se na ação da droga sobre a pápula e eritema induzidos por teste cutâneo, embora a potência da droga na supressão da reação pápula-eritema não possa ser diretamente extrapolada para sua eficácia clínica no tratamento das doenças mediadas pela histamina. Não há conhecimento sobre estudos comparando a eficácia da hidroxizina, AHs seguro, com valor terapêutico nos eczemas que apresentam prurido intenso pelo seu efeito sedativo, com os AHns, como fexofenadina, desloratadina e epinastina, através do teste cutâneo por puntura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Dois estudos foram realizados para atingir os objetivos estabelecidos na pesquisa:

- Estudo da ação dos anti-histamínicos sedante e não-sedantes nos testes cutâneos por puntura, analisada através do método da fotografia digital e;
- Análise por imagem tridimensional das reações induzidas pelos testes cutâneos por puntura.

3.1 AÇÃO DOS ANTI-HISTAMÍNICOS SEDANTE E NÃO-SEDANTES NOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA, ANALISADA ATRAVÉS DO MÉTODO DA FOTOGRAFIA DIGITAL

3.1.1 Desenho

Foi realizado um estudo experimental, transversal, prospectivo, analítico, duplo-cego e randomizado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e todos os sujeitos forneceram consentimento informado assinado (aprovação no Anexo 1).

3.1.2 Sujeitos

Setenta e cinco voluntários (estudantes e funcionários do HC, UFPR, Brasil) foram incluídos neste estudo (idade entre 19 a 61 anos, mediana de $28,8 \pm 8,9$; 42 deles do sexo feminino). Nenhum deles foi tratado com anti-histamínicos (AH), estabilizadores de membrana dos mastócitos ou corticosteróides durante as duas semanas que precederam o teste. Sujeitos sob imunoterapia ou doenças dermatológicas no local do teste foram excluídos.

3.1.3 Teste Clínico

Os sujeitos receberam dose única oral de hidroxizina (25mg), fexofenadina (120mg), epinastina (20mg), desloratadina (5mg) ou placebo. Em cada grupo de medicação participaram 15 voluntários. As doses dos AH foram escolhidas de acordo com as recomendações de consenso no tratamento de rinite e urticária alérgica (BOUSQUET et al., 2003; ZUBERBIER et al., 2006). O placebo foi administrado em forma de tablete contendo 25mg de lactose.

3.1.4 Testes Cutâneos por Puntura

Os testes cutâneos por puntura foram realizados antes da ingestão de AH ou placebo e 4 horas após a ingestão (VIEIRA DOS SANTOS, TITUS e CAVALCANTE LIMA, 2007). Resumidamente, uma gota de extrato de histamina (10mg/mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil), uma de *D. pteronyssinus* (113KU/mL, São Paulo, Brasil) e uma de solução salina (IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) foram aplicadas na superfície anterior do antebraço esquerdo. Agulhas descartáveis 26-G foram usadas em todos os testes. Os testes foram avaliados 10 minutos após a puntura por fotografia digital e cálculo do diâmetro médio pela régua milimetrada e transparente. O resultado foi considerado positivo quando o tamanho da pápula foi $\geq 3\text{mm}$ ou $\geq 7\text{mm}^2$ e eritema $\geq 10\text{mm}$ ou $\geq 80\text{mm}^2$ (BERNSTEIN e STORMS, 1995; NELSON et al., 1993).

3.1.5 Avaliação do Teste Cutâneo por Puntura

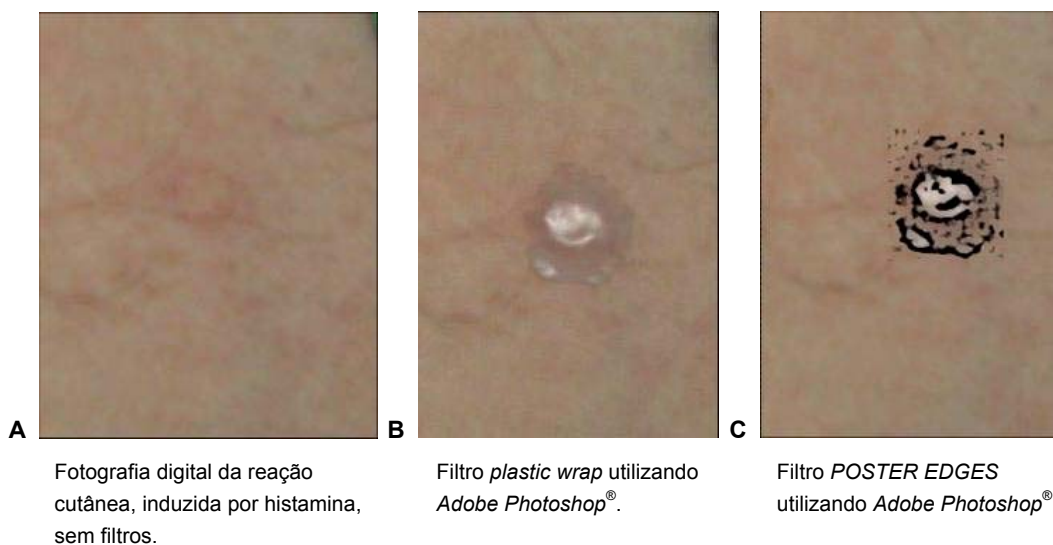
As imagens das reações cutâneas, no local do teste, foram obtidas por meio de máquina fotográfica Olympus 650 C[®] e analisadas através do software *Adobe Photoshop*[®] 6.0 (VIEIRA DOS SANTOS, TITUS e CAVALCANTE LIMA, 2007). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. As medidas dos diâmetros (do maior e do menor perpendicular àquele) da pápula e do eritema foram determinadas com

régua milimetrada transparente e com ferramentas do software *Adobe Photoshop*[®] 6.0 na imagem fotográfica digital. O diâmetro médio foi calculado em milímetros.

3.1.5.1 Determinação da área da pápula pela fotografia digital

Para avaliação da pápula, por fotografia digital, foi selecionada uma região ao redor da reação e se determinou o contorno da pápula com dois filtros de transformação de imagem, o *Plastic Wrap* e o *Poster Edges*, aplicados pelo software *Adobe Photoshop* 6.0[®] (figura 10A, B e C). Uma correlação matemática foi estabelecida comparando a quantidade de *pixels* da área da pápula com os da área conhecida. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

FIGURA 10 - FILTROS PARA CONTORNO DA PÁPULA



FONTE: A autora

3.1.5.2 Determinação da área do eritema pela fotografia digital

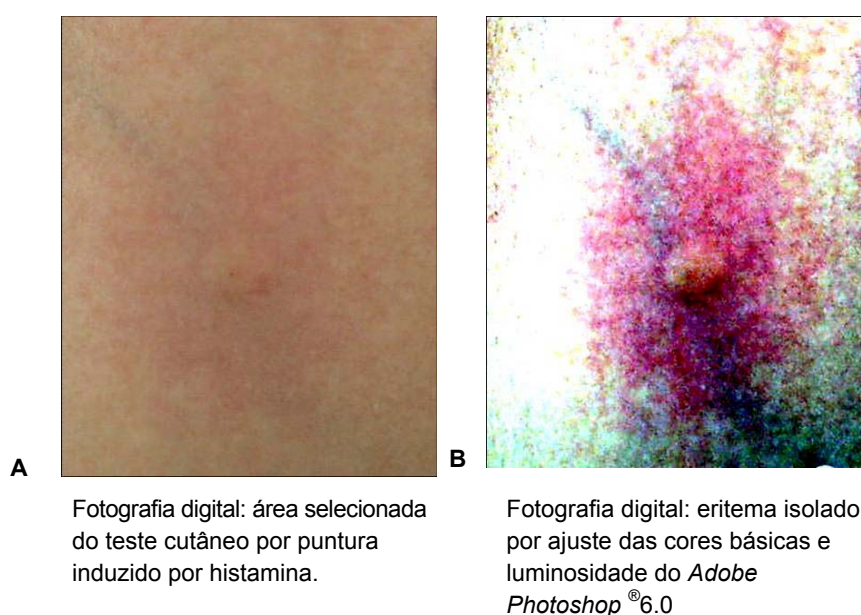
Para avaliação da área do eritema pela fotografia digital, recorreu-se à área previamente conhecida colocada próxima ao local do teste. As fotos armazenadas foram analisadas com auxílio do software *Adobe Photoshop* 6.0[®].

O local do eritema foi selecionado e, nessa imagem, foi feito o ajuste de níveis das cores básicas e da luminosidade (figura 11A e B). Uma cor do eritema e

todas as cores similares foram selecionadas com a ferramenta *magic wand*, chegando-se ao tamanho por ferramenta "histograma". A quantidade de *pixels* foi comparada àquela da área conhecida.

Uma vez obtida a área de cada eritema nos diferentes pontos de análise, seus dados foram colocados no software *Microsoft Excel*[®] e analisados, com dados em média \pm erro padrão.

FIGURA 11 - FOTOGRAFIA DIGITAL AO 10.^o MINUTO PÓS-PUNTURA. ÁREA SELECIONADA DO LOCAL DA PUNTURA UTILIZANDO A HISTAMINA



FONTE: A autora

3.1.6 Análise Estatística

Para avaliação das diferenças entre os tempos, empregou-se ANOVA, e teste exato de Fisher para análise dos resultados positivos ou negativos, em porcentagem.

Para a comparação dos diferentes métodos de obtenção das medidas da pápula e do eritema, utilizou-se regressão linear ou polinomial.

O valor de $p < 0,05$ foi associado à significância estatística. Os dados foram analisados com auxílio dos softwares *Statistica*[®] (Statsoft, USA) e *JMP*[®] (SAS Institute, USA).

3.2 ANÁLISE POR IMAGEM TRIDIMENSIONAL DAS REAÇÕES INDUZIDAS PELOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA

3.2.1 Desenho

Foi realizado um estudo experimental, transversal, prospectivo e analítico, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Medicina Charité (Berlim, Alemanha), onde foi realizado, após o consentimento informado de todos os indivíduos participantes (aprovação no Anexo 1).

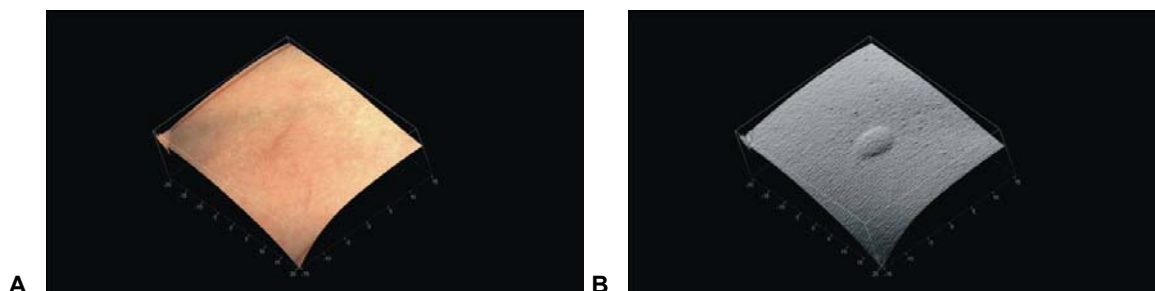
3.2.2 Sujeitos

Dez voluntários, cinco deles com história positiva para rinite alérgica, participaram deste estudo. Nenhum deles foi tratado com anti-histamínicos, estabilizadores de membrana dos mastócitos ou corticosteróides durante as duas semanas que antecederam o teste. Sujeitos sob imunoterapia ou doenças dermatológicas no local do teste foram excluídos.

3.2.3 Captura da Imagem Tridimensional

As imagens 3D (figura 12 A e B) foram obtidas usando um sistema de *scanner* óptico e câmera de alta resolução (Primos 5.075 D[®]).

FIGURA 12 - IMAGEM TRIDIMENSIONAL (3D) DA PÁPULA INDUZIDA NO DÉCIMO MINUTO APÓS PUNTURA



A

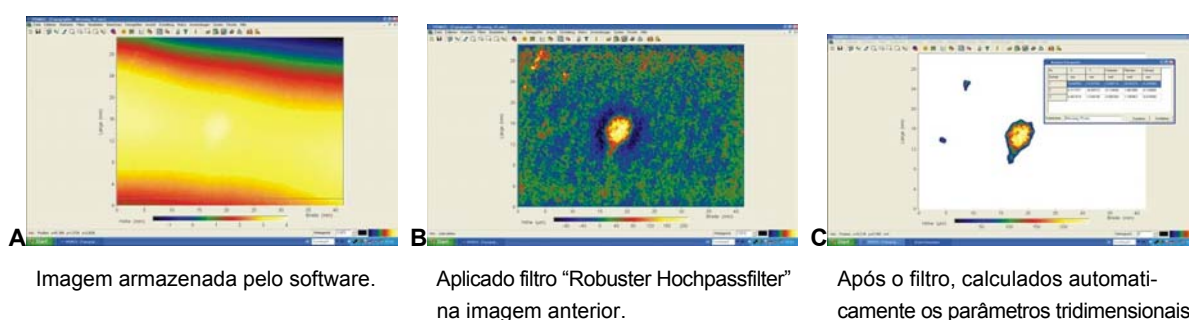
Imagem 3D na cor da pele.

B

Textura em cor cinza, aplicada por ferramenta contida no software *Primos 5.075 D*

A região a ser medida foi centralizada na imagem de cruz (cruz projetada no objeto a ser medido pelo próprio aparelho) e armazenadas em formato JPEG, omc e kam. As imagens em omc (figura 13A) foram realizadas através do software *GMF Primos 5.075 D*[®]. As ferramentas utilizadas foram um filtro chamado *Robuster Hochpassfilter* (figura 13B) e *Knoten- Parameter bestimmen* (figura 13C). Os parâmetros volume, área e altura foram obtidos automaticamente.

FIGURA 13 - IMAGEM NO SOFTWARE *GMF*: PÁPULA PELO ALÉRGENO IMAGEM ARMAZENADA PELO SOFTWARE *GMF PRIMOS 5.075 D*[®]. PÁPULA INDUZIDA PELO ALÉRGENO, NO 10.^o MIN PÓS-PUNTURA



3.2.4 Teste de Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do novo método foi conduzida em dois estágios. O primeiro envolveu a medição de uma figura de área conhecida (*in vitro*). O segundo envolveu a medição de reações cutâneas induzidas pelo teste cutâneo por puntura (*in vivo*).

3.2.4.1 *In vitro*

Para o teste de reprodutibilidade *in vitro*, foi utilizada uma figura (adesivo redondo de área conhecida) como modelo. Foram obtidas imagens 3D da mesma figura 10 vezes, em dias diferentes, por dois observadores. A variabilidade intra e interobservador foi determinada através do coeficiente de variação (CV) entre as 20 medidas da mesma figura.

3.2.4.2 *In vivo*

Para o teste de reprodutibilidade *in vivo*, foram realizados testes cutâneos por puntura em 10 voluntários. Em cada um deles, aplicou-se uma gota de histamina (10mg/mL, ALK-Abelló), uma de solução salina (ALK-Abelló) e uma de extrato de *D. pteronyssinus* (ALK-Abelló) na superfície anterior do antebraço esquerdo, à distâncias mínimas de 3cm entre os extratos. Foi usada uma lanceta estéril, com ponta de 1mm de espessura, para cada gota de extrato. A lanceta foi pressionada através da gota, formando um ângulo de 90° com a pele. As gotas foram removidas no primeiro minuto após a puntura. Todos os testes cutâneos foram feitos pelo mesmo médico treinado no procedimento. Antes de realizar o teste, os pêlos longos apresentados no local do teste por alguns dos voluntários foram cortados com tesoura. As imagens 3D foram obtidas nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos após a puntura. Em cada tempo de análise, as imagens foram obtidas por dois observadores.

3.2.5 Teste de Acurácia

Para avaliar a acurácia, dois observadores mediram o diâmetro mais longo (D1) e o mais curto, perpendicular àquele (D2) da pápula, com régua transparente e milimetrada, imediatamente após a obtenção da imagem 3D da reação. O diâmetro médio (em mm) foi calculado $(D1+D2)/2$. As áreas das pápulas foram calculadas por meio da seguinte fórmula matemática: $\text{área (mm}^2\text{)} = 3,14 \times [((D1/2) + (D2/2))/2]^2$. Os valores do tamanho das pápulas foram comparados interobservador e entre os dois métodos.

O coeficiente de variação (CV = desvio padrão X 100/ média da amostra) das dez medidas da figura feitas pelo mesmo observador foi calculado para determinar a variabilidade intraobservador. Para analisar o CV interobservador, foi utilizada a seguinte fórmula: $[(\text{média da amostra do observador 1} - \text{média do observador 2}) / (\text{média da amostra do observador 1} + \text{média do observador 2} / 2)] \times 100$. *In vivo*, o CV interobservador foi calculado em cada tempo de análise.

O sistema de calibração do aparelho foi avaliado três vezes durante o estudo, para confiabilidade da reprodução de imagens.

3.2.6 Análise Estatística

Os valores obtidos pelas medições *in vitro* e *in vivo* foram digitados em planilha eletrônica (*Microsoft Excel*[®]), conferidos e exportados para o software *SPSS*[®], 13.0 para *Windows*[®]. Para avaliar as diferenças dos valores médios de cada parâmetro (volume, área e altura), obtidos interobservador e entre os métodos, foi aplicado o teste t de *Student* para amostras dependentes. Os testes de regressão simples e polinomial foram aplicados para correlacionar os resultados intra e interobservador. Para avaliar a especificidade e sensibilidade, foi aplicada a curva ROC. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

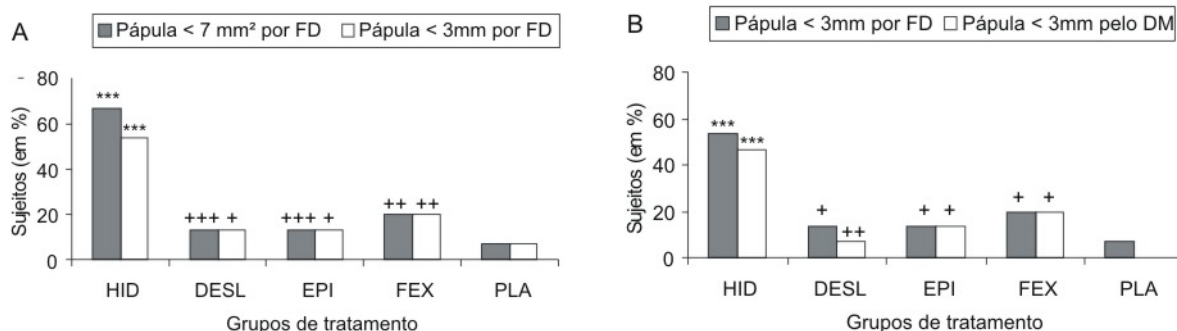
4 RESULTADOS

4.1 AÇÃO DOS ANTI-HISTAMÍNICOS SEDANTE E NÃO-SEDANTES NOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA, ANALISADA ATRAVÉS DO MÉTODO DA FOTOGRAFIA DIGITAL

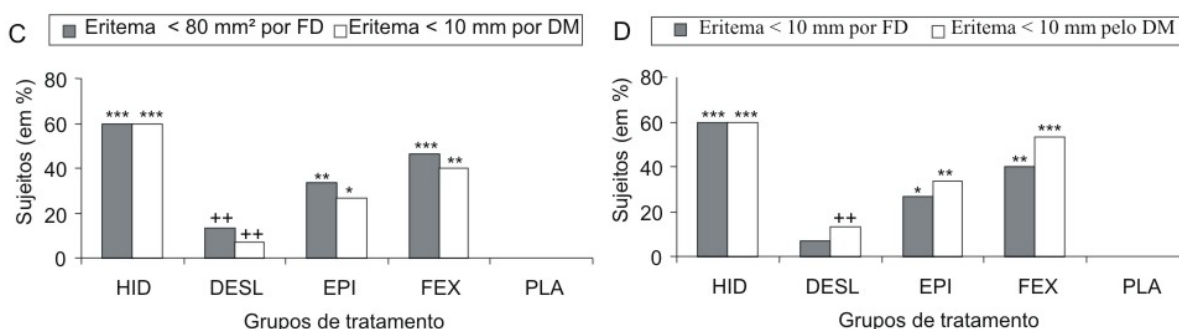
A fexofenadina, epinastina e desloratadina, administradas em doses recomendadas, preveniram os testes cutâneos por puntura positivo à histamina em somente 10 a 20% dos sujeitos testados, avaliados por fotografia digital (figura 15A). Ao contrário, mais de 50% de todos que tomaram hidroxizina apresentaram teste cutâneo negativo à histamina. Como ilustrado na figura 15B, resultados idênticos foram obtidos através do cálculo do diâmetro médio. A supressão máxima foi vista nos sujeitos que utilizaram hidroxizina (75% de redução para histamina). Reduções menores no tamanho da pápula induzida por histamina foram vistas nos grupos que utilizaram AHns, isto é, 32%, 55% e 58% de supressão nos sujeitos tratados com desloratadina, epinastina e fexofenadina, respectivamente.

Resultados similares, embora menos pronunciados, foram encontrados ao se comparar o tamanho do eritema das reações cutâneas à histamina nos sujeitos tratados com AH (figura 15C e D). A hidroxizina preveniu o desenvolvimento do eritema em 60% de todos os sujeitos testados (figura 15C). Já no grupo dos indivíduos que receberam AHns, observou-se prevenção da reação em somente 8% (desloratadina), 24% (epinastina) e 40% (fexofenadina) dos sujeitos. Avaliando o tamanho do eritema pela fotografia digital e pelo diâmetro médio, os resultados foram equivalentes (figura 15D).

FIGURA 14 - SUPRESSÃO DAS REAÇÕES CUTÂNEAS, INDUZIDAS POR HISTAMINA NOS VOLUNTÁRIOS TRATADOS, PELOS ANTI-HISTAMÍNICOS



A + B: Supressão da pápula induzida pela histamina através dos testes cutâneos por puntura (A = fotografia digital [FD], área e diâmetro médio pela FD; B = fotografia digital e diâmetro médio pela régua [DM]).



C + D: Supressão do eritema induzido pela histamina através dos testes cutâneos por puntura (C = fotografia digital [FD], área e diâmetro médio pela FD; D = fotografia digital e diâmetro médio pela régua [DM]).

NOTA: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ vs. placebo. + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$ vs. hidroxizina.

Abreviaturas: HID = Hidroxizina 25 mg; DES = Desloratadina 5 mg; EPI = Epinastina 20 mg; FEX = Fexofenadina 120 mg; PLA = Placebo.

A Hidroxizina é mais eficaz que desloratadina, epinastina ou fexofenadina na supressão das reações cutâneas por puntura induzidas por histamina nos voluntários tratados.

Para avaliar se AHns e hidroxizina também diferem na eficácia em suprimir reações cutâneas induzidas por alérgeno, foi realizado um estudo piloto e avaliados os efeitos dos AH nas reações cutâneas por puntura induzidas em sujeitos sensibilizados pelo *D. pteronyssinus* ($n = 31$), tratados com placebo, hidroxizina ou AHns. Os testes cutâneos por puntura foram negativos em somente metade ou menos que a metade de todos os sujeitos tratados com AHns (tabela 1). Por outro lado, mais de 70% de

todos que tomaram hidroxizina apresentaram testes cutâneos negativos, avaliados pela fotografia digital e pelo diâmetro médio (tabela 1).

TABELA 1 - TESTES NEGATIVOS AO ALÉRGENO APÓS ANTI-HISTAMÍNICOS NÚMERO DOS SUJEITOS QUE APRESENTARAM TESTE CUTÂNEO POR PUNTURA NEGATIVO AO *D. PTERONYSSINUS* APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DOS ANTI-HISTAMÍNICOS

TRATAMENTO	PÁPULA (total dos responsivos à medicação)			ERITEMA (total dos responsivos à medicação)		
	Área por FD (< 7 mm ²)	Diâmetro por FD (< 3 mm)	Diâmetro por DM (< 3 mm)	Área por FD (< 80 mm ²)	Diâmetro por FD (< 10 mm)	Diâmetro por DM (< 10 mm)
Hidroxizina (n=7)	(*)5	(*)4	(*)4	(**)5	(*)4	(*)4
Desloratadina (n=6)	(*)1	(*)0	(*)1	(*)1	(*)0	1
Epinastina (n=6)	3	2	3	(*)3	2	(*)3
Fexofenadina (n=6)	2	2	3	2	2	(*)3
Placebo (n=6)	0	(*)0	(*)0	(++)0	(*)0	(*)0

NOTA: FD = fotografia digital; DM = diâmetro médio pela régua.

(*) p<0.05

(**) p<0.01

(+) p<0.05

(++) p<0.01

A hidroxizina é mais eficaz que desloratadina, epinastina ou fexofenadina na supressão das reações cutâneas por puntura induzidas por *D. pteronyssinus* nos voluntários tratados.

4.2 ANÁLISE POR IMAGEM TRIDIMENSIONAL DAS REAÇÕES INDUZIDAS PELOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA

Todos os dez voluntários (6 do sexo masculino, idade entre 25 e 36 anos, com uma mediana de 28,6 ± 3,62 anos) apresentaram TCP positivos para histamina. No total, 120 imagens com testes positivos (80 pápulas induzidas pela histamina e 40 pelo *D. pteronyssinus*) foram analisadas.

4.2.1 Analisando a Reprodutibilidade do Método de Imagem Tridimensional

4.2.1.1 Análises das imagens 3D da figura (*in vitro*)

A média do CV interobservador foi de 0,43%, 0,02% e 1,73% e a média do CV intraobservador foi de 0,83%, 0,36% e 5,15%, para volume, área e altura, respectivamente. Os valores médios da média e do desvio padrão (SD) obtidos a partir de cada parâmetro da imagem 3D pelos dois observadores estão representados na tabela 2.

TABELA 2 - VALORES DAS MEDIDAS *IN VITRO* MÉDIA DOS VALORES DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA VOLUME, ÁREA E ALTURA, DAS MEDIDAS REPETIDAS *IN VITRO*

FIGURA (50 mm ²)	VOLUME (mm ³)	ÁREA (mm ²)	ALTURA (mm)
Média 1 / SD	1,61 / 0,014	49,916 / 0,201	0,058 / 0,004
Média 2 / SD	1,617 / 0,013	49,904 / 0,163	0,057 / 0,002

NOTA: Média 1 = média obtida pelo observador 1; média 2 = média obtida pelo observador 2.

4.2.1.2 Análises das imagens 3D da reação cutânea (*in vivo*)

O CV na mesma reação, em cada ponto de análise (interobservador), é mostrado na tabela 3. O CV interobservador variou de 0,24 a 9,8%, quando considerados todos os parâmetros. Nos parâmetros volume e área, o CV interobservador foi maior no 5.^o minuto para a reação induzida pelo *D. pteronyssinus* do que para histamina (tabela 3).

TABELA 3 - REPRODUTIBILIDADE, *IN VIVO*, DA IMAGEM 3D EXPRESSA PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV), DOS PARÂMETROS 3D, *IN VIVO*, NO 5.^o, 10.^o, 15.^o E 20.^o MINUTO PÓS-PUNTURA

MÉTODO 3D	5'	10'	15'	20'
Volume (mm ³)	3,42 / 9,8	0,5 / 4,48	1,54 / 0,6	1,79 / 2,38
Área (mm ²)	3,09 / 5,61	1,73 / 0,61	1,81 / 1,88	0,24 / 0,42
Altura (mm)	2,65 / 2,57	2,31 / 6,68	4,4 / 2,6	2,16 / 1,1

NOTA: O primeiro CV corresponde ao CV da pápula induzida pela histamina e o segundo ao da pápula induzida pelo alérgeno

4.2.2 Avaliando a Reprodutibilidade do Método da Medida do Diâmetro (*In Vivo*)

O CV na mesma reação em cada ponto de análise (interobservador) é mostrado na tabela 4.

TABELA 4 - REPRODUTIBILIDADE, *IN VIVO*, DO MÉTODO DO DIÂMETRO EXPRESSA PELO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV), DO MÉTODO DO DIÂMETRO, *IN VIVO*, NO 5.º, 10.º, 15.º E 20.º MINUTO PÓS-PUNTURA

MÉTODO DO DIÂMETRO	5'	10'	15'	20'
Tamanho da pápula (mm ²)	5,82 / 87,9	6,38 / 26,3	6,5 / 21,1	4,92 / 13,8
Tamanho da pápula (mm)	3,28 / 44,6	4,0 / 13,33	3,9 / 13,0	3,3 / 7,0

NOTA: O primeiro CV corresponde ao CV da pápula induzida pela histamina e o segundo ao da pápula induzida pelo alérgeno.

O CV interobservador do método do diâmetro médio variou de 3,28 a 87,9%. Neste método, o CV foi maior para a área da pápula do que para o diâmetro médio e maior para as pápulas induzidas pelo *D. pteronyssinus* do que pela histamina, até o 20.º minuto. A análise de cada parâmetro, por regressão simples, pode ser vista na tabela 5.

TABELA 5 - REPRODUTIBILIDADE EXPRESSA PELO r^2 ADJUST CALCULADO POR REGRESSÃO SIMPLES, PARA CADA TEMPO DE ANÁLISE, DOS MÉTODOS 3D E DIÂMETRO

MÉTODOS 3D E DIÂMETRO	5'	10'	15'	20'
Histamina				
Volume (mm ³)	0,95	0,98	0,98	0,94
Área (mm ²)	0,98	0,98	0,98	0,93
Altura (mm)	0,72	0,87	0,77	0,90
Diâmetro (mm ²)	0,60	0,76	0,50	0,50
Diâmetro (mm)	0,70	0,80	0,50	0,50
<i>D. pteronyssinus</i>				
Volume (mm ³)	0,97	0,96	0,90	0,90
Área (mm ²)	0,99	0,90	0,95	0,94
Altura (mm)	0,73	0,90	0,90	0,90
Diâmetro (mm ²)	0,50	0,70	0,70	0,76
Diâmetro (mm)	0,70	0,80	0,70	0,75

4.2.3 Avaliação da Acurácia

A acurácia foi avaliada pela comparação dos valores obtidos pela imagem 3D com os valores obtidos pela medida dos diâmetros, expressos em mm. As correlações foram similares para histamina e *D. pteronyssinus*. Houve boa correlação entre os

parâmetros área e volume da imagem 3D (r^2 *adjust* = 0,73 e 0,78, observador 1 e 2, respectivamente, para o volume, e r^2 *adjust* = 0,91 e 0,93 observador 1 e 2, respectivamente, para a área). Não houve boa correlação com o parâmetro altura (r^2 *adjust* = 0,44 – 0,47, observador 1 e 2, respectivamente) (tabela 6).

TABELA 6 - ACURÁCIA EXPRESSA PELO r^2 *ADJUST* CALCULADO POR REGRESSÃO POLINOMIAL NO TEMPO TOTAL DE ANÁLISE

PARÂMETROS DA PÁPULA NO TEMPO TOTAL	OBSERVADOR 1	OBSERVADOR 2
Histamina		
Volume X Área	0,85	0,84
Área X Altura	0,4	0,37
Altura X Volume	0,6	0,61
Volume X Diâmetro	0,73	0,78
Área X Diâmetro	0,91	0,93
Altura X Diâmetro	0,44	0,47
<i>D. pteronyssinus</i>		
Volume X Área	0,9	0,91
Área X Altura	0,37	0,36
Altura X Volume	0,6	0,55
Volume X Diâmetro	0,7	0,74
Área X Diâmetro	0,86	0,88
Altura X Diâmetro	0,4	0,42

NOTA: Valores obtidos pelos observadores 1 e 2.

4.2.4 Calibração

Não houve diferença nos valores das três calibrações realizadas durante o estudo.

4.2.5 Curva ROC

Comparou-se a variação da sensibilidade e especificidade do método de leitura do TCP por meio de imagem 3D com o método do diâmetro médio pela régua, aplicando a curva ROC em cada período de tempo analisado. Nessa amostra, não houve número de falsos positivos ou falsos negativos. A partir do 5.^o minuto após a puntura, todos os testes positivos ao método do diâmetro médio pela régua também o foram para o método da imagem 3D. Procedeu-se da mesma forma com relação aos testes negativos.

5 DISCUSSÃO

5.1 AÇÃO DOS ANTI-HISTAMÍNICOS SEDANTE E NÃO-SEDANTES NOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA, ANALISADA ATRAVÉS DO MÉTODO DA FOTOGRAFIA DIGITAL

No presente estudo, a hidroxizina foi comparada à desloratadina, epinastina e fexofenadina, três anti-histamínicos não-sedantes. Observa-se que esses três AHns foram menos efetivos que a hidroxizina na prevenção da formação da pápula e do eritema induzidos por histamina e alérgeno, quando administrados nas doses diárias recomendadas.

Similar à literatura, no grupo placebo observou-se nenhuma ou mínima supressão da reação (PUROHIT et al., 2001; PUROHIT et al., 2003; GRANT et al., 1999; GOETZ et al., 1991; ROONGAPINUN et al., 2004; PUROHIT et al., 2004; KALINER et al., 2003). Já a hidroxizina se revelou um potente supressor (SIMONS, SUSSMAN e SIMONS, 1995). A desloratadina (PUROHIT et al., 2003), fexofenadina e epinastina (GRANT et al., 1999) apresentaram potência intermediária na supressão da formação da pápula induzida por histamina.

Nenhum dos anti-histamínicos utilizados neste estudo foi testado anteriormente para avaliação de seus efeitos na supressão da formação da pápula induzida por alérgeno, pelo teste cutâneo por puntura. Entretanto, a hidroxizina e fexofenadina têm sido avaliadas por injeção intradérmica. Interessantemente, esses estudos mostram efeitos supressivos similares àqueles observados pela hidroxizina e fexofenadina neste estudo. Por exemplo, a hidroxizina (25mg) suprimiu em 57% das formações das pápulas induzidas por alérgeno (teste por puntura) neste estudo quando comparada à supressão de 63% observada no estudo de Cook *et al.* (teste intradérmico) (COOK et al., 1973).

A fotografia digital foi utilizada previamente para interpretar o teste cutâneo por puntura (VIEIRA DOS SANTOS, TITUS e CAVALCANTE LIMA, 2007). Os resultados

aqui apresentados validaram o uso dessa técnica, já que os resultados são similares aos obtidos pela interpretação macroscópica feita pela régua. Logo, a fotografia digital é um método simples e válido para avaliar a resposta ao teste cutâneo por puntura, especialmente em estudos clínicos, nos quais minimizar as diferenças interobservadores dos resultados obtidos pode ser útil e muito importante.

A potência de cada AHns na supressão da pápula induzida por histamina ou alérgeno não pode ser diretamente extrapolada para sua eficácia clínica no tratamento de todas as doenças mediadas pela histamina (PERSI et al., 1999). Entretanto, nossos achados indicam que AHns, administrados em dose única diária, são geralmente menos efetivos que a hidroxizina, AHs, na prevenção de reações cutâneas por puntura induzidas por histamina ou alérgeno. Isto sugere que os AHns também podem ser menos efetivos que os AHs quando administrados nas doses recomendadas no tratamento de dermatoses dependentes de histamina. Esta hipótese, entretanto, precisa de confirmação, que pode ser obtida por meio de estudos comparando os AHns com AHs na urticária, por exemplo.

5.2 ANÁLISE POR IMAGEM TRIDIMENSIONAL DAS REAÇÕES INDUZIDAS PELOS TESTES CUTÂNEOS POR PUNTURA

Os resultados dos testes cutâneos por puntura foram baseados no tamanho das pápulas. Na rotina clínica e em vários estudos, os resultados são estimados pelo diâmetro médio, em milímetros, medidos com uma régua transparente (KALINER et al., 2003; PIETTE et al., 2002). Poulsen e Pijnenborg descreveram um método considerado preciso para quantificar a reação induzida pelo teste cutâneo por puntura baseado em imagem obtida do contorno da pápula, feita à mão, com uma caneta, transferida para uma fita adesiva e, então, escaneada. A área da pápula é calculada por meio de um software específico (POULSEN et al., 1993; PIJNENBORG, NILSSON e DREBORG, 1996). Um novo software foi desenvolvido para esse cálculo (WOHRL et al., 2006), que possibilita calcular o tamanho da pápula de forma automática.

Embora mais preciso que os métodos convencionais, a imagem inicial da pápula é gerada a partir do contorno manual da mesma.

Recentemente, foi relatado o método de leitura do TCP usando a fotografia digital (VIEIRA DOS SANTOS, TITUS e CAVALCANTE LIMA, 2007), que apesar de ser objetivo para análise, é um método que foi testado apenas *in vivo* e precisa ser automatizado.

Neste estudo, foi demonstrado um método novo de avaliação do TCP usando o sistema de *scanner* óptico PRIMOS 3D, um novo instrumento para análise tridimensional.

O contorno da pápula e os dados matemáticos do volume, área e altura são armazenados e fornecidos automaticamente pelo sistema, sem contato direto com a pele. Por meio desse método, obtém-se imagem do TCP em fotografia com formato 3D, o que permite a documentação padronizada do teste, sua interpretação em diferentes centros de estudos, podendo levar a novas idéias e a técnicas de medida aplicáveis anos após o término de um estudo.

Analisando o TCP ao 20.^o minuto, o maior CV para a imagem 3D foi de 2,38% e, para o método do diâmetro, foi de 13,8%. O CV pela fotografia digital foi de 5,95%, maior que o obtido pela imagem 3D.

Comparando o CV entre os maiores e menores valores das pápulas, obtidos pela imagem 3D (ao 5.^o e ao 20.^o minuto, respectivamente), os resultados foram melhores para as pápulas de tamanho maior. Pijnenborg, Nilsson e Dreborg também encontraram melhor congruência entre o método do diâmetro e da área pelo *scanner* com pápulas maiores. Mesmo para pápulas menores, o CV para aquelas induzidas pela histamina foi menor que 3,5% e, para pápulas induzidas pelo alérgeno, menor que 9,8%. Esta diferença pode ser justificada pelo fato de a reação cutânea induzida pelo alérgeno ser mais lenta do que a induzida pela histamina e pela indefinição dos contornos no início da reação.

A reprodutibilidade da leitura do TCP tem sido relatada em vários estudos. Para o método do diâmetro, o CV varia de 7 a 80% (DREBORG et al., 1987; EICHLER et al., 1988; VOHLONEN et al., 1989). Para o método da área pelo *scanner*, o c.v.

médio intraobservador foi 1,43% e interobservador 2,34% *in vitro*. Já *in vivo*, foram encontrados o CV médio para os testes duplicados induzidos pela histamina de 30,4% e para o alérgeno de 39,8% (PIJNENBORG, NILSSON e DREBORG, 1996). No presente estudo, pela imagem 3D, o CV médio intraobservador para área da pápula foi de 0,36% e, interobservador, de 0,024%. O maior CV para pápula induzida pela histamina foi de 3,09% e, induzida pelo alérgeno, de 5,61%. Estes resultados são melhores que os encontrados pelo método da área pelo *scanner* ou por outros métodos descritos anteriormente.

Os valores dos parâmetros volume e altura também se mostraram precisos e repetitivos. Interessantemente, a imagem fotográfica, armazenada em formato JPEG, é obtida automática e simultaneamente à imagem 3D, na mesma distância e luz, e ambas podem ser usadas posteriormente para análise da intensidade e área do eritema, possibilitando melhor compreensão da relação entre pápula e eritema induzidos por alérgenos. Pela sincronização na coleta de dados, precisão, acurácia, fácil manuseio do aparelho e técnica simples de análise, esse método pode ser facilmente aceito como método padrão de leitura do teste cutâneo por puntura.

6 CONCLUSÃO

É possível avaliar a ação dos anti-histamínicos sedante e não-sedantes através do método da fotografia digital com acurácia e objetividade;

A hidroxizina é um inibidor mais potente das reações cutâneas, induzidas por histamina e *D. pteronyssinus*, do que a desloratadina, epinastina e fexofenadina.

O método de imagem tridimensional é simples, altamente reprodutível e o mais preciso para a leitura dos testes cutâneos por puntura.

6.1 COMENTÁRIOS FINAIS

Pela hidroxizina apresentar maior poder de supressão da pápula e do eritema induzidos pelo TCP do que anti-histamínicos não-sedantes, sugere-se que a dose diária recomendada da hidroxizina e dos AHns não são bioequivalentes na supressão da inflamação cutânea mediada pela histamina. Mais estudos de testes diagnósticos, como o TCP, associados a clínicos são necessários para melhor avaliação dos efeitos das drogas anti-histamínicas nas doenças mediadas pela histamina. Ainda, não participaram indivíduos negros neste estudo, o que poderia ter causado diferenças nos resultados da comparação entre os dois métodos de leitura, uma vez que o método do diâmetro médio pela régua é subjetivo.

O sistema de *scanner* óptico (Primos 5.075 D) é de fácil manuseio, possibilita captura rápida e simultânea de fotografias digitais em formato JPEG e imagens tridimensionais. O software *GMF Primos 5.075 D* calcula automaticamente os parâmetros 3D da pápula induzida pelo teste cutâneo por puntura, independentemente do observador, das configurações geométricas e do tamanho da pápula. Possui, ainda, ferramentas que possibilitam análise de lesões cutâneas avaliadas em diferentes tempos, importante em várias situações dermatológicas.

Estudo para avaliar o efeito de um anestésico tópico (EMLA) na inflamação cutânea induzida pela histamina e alérgeno no TCP, utilizando medidas volumétricas e termográficas da reação, associadas à cinética do eritema analisada através da fotografia digital, está sendo realizado.

REFERÊNCIAS

- AAS, K. Clinical and experimental aspects of standardization and purification of allergen. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol*, v.49, n.1-2, p.44-54, 1975.
- ANDERSON, M.W.; DESHAZO, R.D. Studies of the mechanism of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-associated angioedema: the effect of an ACE inhibitor on cutaneous responses to bradykinin, codeine, and histamine. *J Allergy Clin Immunol*, v.85, n.5, p.856-858, 1990.
- ATNER, D.; THOMAS, C.O.; BICKERS, D. The users of digital photography in dermatology. *J Am Acad Dermatol*, v.41, n.5, p.749-756, 1999.
- BAGNATO, G.F.; GULLI, S.; DENUZZO, G.; DI CESARE, E.; SANSOTTA, C.; D'AMBROSIO, F.P.; VERMIGLIO, G. Measurement of allergen-induced skin reactions by computerized dynamic telethermography (CDTT). *J Investig Allergol Clin Immunol*, v.7, n.4, p.238-241, 1997.
- BARBEE, R.A.; BROWN, W.G.; KALTENBORN, W.; HALONEN, M. Allergen skin-test reactivity in a community population sample: correlation with age, histamine skin reactions and total serum immunoglobulin E. *J Allergy Clin Immunol*, v.68, n.1, p.15-19, 1981.
- BERNSTEIN, L.; STORMS, W.W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. *Ann Allergy Asthma Immunol*, v.75, p.553-625, 1995.
- BOUSQUET, J.; MAURICE, F.; RIVORY, J.P.; SKASSA-BROCIEK, W.; FLORENCE, P.; CHOUZENOUX, R.; MION, C.; MICHEL, F.B. Allergy in long-term hemodialysis. II. Allergic and atopic patterns of a population of patients undergoing long-term hemodialysis. *J Allergy Clin Immunol*, v.81, n.3, p.605-610, 1988.
- BOUSQUET, J.; PUJOL, J.L.; BARNEON, G.; HEJJAOU, A.; NARDOUX, J.; AUSSEIL, M.; GODARD, P.; JOYEUX, H.; MICHEL, F.B. Skin test reactivity in patients suffering from lung and breast cancer. *J Allergy Clin Immunol*, v.87, n.6, p.1066-1072, 1991.
- BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; BACHERT, C.; CANONICA, G.W.; DEMOLY, P. et al. Requirements for medications commonly used in the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). *Allergy*, v.58, p.192-197, 2003.
- CIPHER, D.J.; HOOKER, R.S.; GUERRA, P. Prescribing trends by nurse practitioners and physician assistants in the United States. *J Am Acad Nurse Pract*, v.18, p.291-296, 2006.
- CLIA Program Clinical Laboratory Improvement Amendments. Disponível em: <<http://www.cms.hhs.gov/>>. Acesso em: 21 abr. 2007.
- CLOUGH, G.F.; BENNETT, A.R.; CHURCH, M.K. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging. *Br J Dermatol*, v.38, n.5, p.806-814, 1998.

- COOK, T.J.; MACQUEEN, D.M.; WITTIG, H.J.; THORNBY, J.I.; LANTOS, R.L.; VIRTUE, C.M. Degree and duration of skin test suppression and side effects with antihistamines. A double blind controlled study with five antihistamines. **J Allergy Clin Immunol**, v.51, p.71-77, 1973.
- DOAN, T.; ZEISS, C.R. Skin testing in allergy. **Allergy Proc**, v.14, n.2, p.110-111, 1993.
- DOLEN, W.K. Skin Testing techniques. **Allergy**, v.56, n.5, p.273-279, 2001.
- DREBORG, S.; BASOMBA, A.; BELIN, L.; DURHAM, S.; EINARSSON, R.; ERIKSSON, N.E.; FROSTAD, A.B.; GRIMMER, O.; HALVORSEN, R.; HOLGERSSON, M. et al. Biological equilibration of allergen preparations: methodological aspects and reproducibility. **Clin Allergy**, v.17, n.6, p.537-550, 1987.
- EICHLER, I.; GOTZ, M.; JARISCH, R.; EICHLER, H.G.; MOSS, R. Reproducibility of skin prick testing with allergen extracts from different manufacturers. **Allergy**, v.43, n.6, p.458-463, 1988.
- FINE, S.R.; FOGARTY, M.; GOEL, Z.; GRIECO, M.H. Correlation of serum theophylline levels with inhibition of allergen and histamine-induced skin tests. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v.61, n.2, p.241-244, 1980.
- FINEMAN, S.; SPECTOR, S.L.; NICKLAS, R.A.; BERNSTEIN, I.L.; BLESSING-MOORE, J.; STRUNK, R.C.; GUTMAN, A.A.; PEARLMAN, D.S.; LEE JR., R.E. Preliminary proposal for practice parameters. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.75, p.482-84, 1995.
- FOREMAN, J.C. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v.83, n.3-4, p.366-371, 1987.
- FREW, A.J.; KAY, A.B. The relationship between infiltrating DC4 lymphocytes, activated eosinophils, and the magnitude of the allergen-induced late-phase cutaneous reaction in man. **J Immunol**, v.141, p.4158-4164, 1988.
- GARCIA-ORTEGA, P.; MERELO, A.; MARRUGAT, J.; RICHART, C.; GARCIA-ORTEGA, P.; MERELO, A.; MARRUGA, J. et al. Decrease of skin and bronchial sensitization following short-intensive scheduled immunotherapy in mite-allergic asthma. **Chest**, v.103, p.183-187, 1993.
- GOETZ, D.W.; JACOBSON, J.M.; APALISKI, S.J.; KEPPEGER, D.W.; MARTIN, M.E. Objective antihistamine side effects are mitigated by evening dosing of hydroxyzine. **Ann Allergy**, v.67, p.448-454, 1991.
- GRANT, J.A.; DANIELSON, L.; RIHOUX, J.P.; DEVOS, C. A double-blind, single-dose, crossover comparison of cetirizine, ebastine, epinastine, fexofenadine, terfenadine, and loratadine versus placebo: suppression of histamine-induced wheal and flare response for 24 h in healthy male subjects. **Allergy**, v.54, p.700-707, 1999.
- GREAVES, M.W. Antihistamines in dermatology. **Skin Pharmacol Physiol**, v.18, p.220-229, 2005.
- HAAHTELA, T.; JOKELA, H. Influence of the pollen season on immediate skin test reactivity to common allergens. **Allergy**, v.35, p.15-21, 1980.

HÄGERMANRK, O.; HÖKFELT, T.; PERNOW, B. Flare and itch induced by substance P in human skin. **J Invest Dermatol**, v.71, p.233-235, 1978.

HAJEER, M.Y.; MAO, Z.; MILLETT, D.T.; AYOUB, A.F.; SIEBERT, J.P. A new Three-Dimensional Method of Assessing Facial Volumetric Changes After Orthognathic Treatment. **Cleft Palate Craniofac J**, v.42, n.2, p.113-120, 2005.

HANDA, S.; DOGRA, S.; KUMAR, B. Comparative efficacy of cetirizine and fexofenadine in the treatment of chronic idiopathic urticaria. **J Dermatolog Treat**, v.15, p.55-57, 2004.

HOLGATE, S.; CHURCH, M.; LAWRENCE, L. **Allergy**. 2.ed. Mosby, 2000.

JOSEPH, C.L.; PETERSON, E.L.; JOHNSON, C.C.; OWNBY, D.R. Racial differences in allergen sensitivity. **Chest**, v.125, n.1, p.85-92, 2004.

KALINER, M.A.; WHITE, M.V.; ECONOMIDES, A.; CRISALIDA, T.; HALE, M.; LIAO, Y.; CHRISTIAN, C.D.; GEORGES, G.C.; WOODWORTH, T.H.; MEEVES, S.G. Relative potency of fexofenadine HCL 180 mg, loratadine 10 mg, and placebo using a skin test model of wheal-and-flare suppression. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.90, p.629-634, 2003.

KALIVAS, J.; BRENEMAN, D.; THARP, M.; BRUCE, S.; BIGHY, M. Urticaria: Clinical efficacy of cetirizine in comparison with hydroxyzine and placebo. **J Allergy Clin Immunol**, v.86, p.1024-1028, 1990.

KALOGEROMITROS, D.; KATSAROU, A.; ARMENAKA, M.; RIGOPOULOS, D.; ZAPANTI, M.; STRATIGOS, I. Influence of the menstrual cycle on skin-prick test reactions to histamine, morphine and allergen. **Clin Exp Allergy**, v.25, n.5, p.461-466, 1995.

KAPLAN, H. Infrared spectral bands: the importance of color in the infrared. **InfraMation, Proceedings**, v.1, n.24-27, p.95-102, 2000.

LEE, D.K.; GARDINER, M.; HAGGART, K.; FUJIHARA, S.; LIPWORTH, B.J. Comparative effects of desloratadine, fexofenadine, and levocetirizine on nasal adenosine monophosphate challenge in patients with perennial allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, v.34, p.650-653, 2004.

LEWIS, T. **The blood vessels of the human skin and their responses**. London: Shaw & Sons, 1927. p.46-466.

LOUKAS, M.; KAPOS, T.; LOUIS JR, R.G.; WARTMAN, C.; JONES, A.; HALLNER, B. Gross anatomical, CT and MRI analyses of the buccal fat pad with special emphasis on volumetric variations. **Surg Radiol Anat**, v.28, n.3, p.254-260, 2006.

MILLER, J.; NELSON, H.S. Suppression of immediate skin tests by ranitidine. **J Allergy Clin Immunol**, v.84, n.6, fasc 1, p.895-899, 1989.

MORGAN, M.M.; KHAN, D.A.; NATHAN, R.A. Treatment for allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria: focus on oral antihistamines. **Ann Pharmacother**, v.39, p.2056-2064, 2005.

NELSON, H. S. Variables in allergy skin testing. **Immunol Allergy Clin North Am**, v.21, n.2, p.281-290, 2001.

- NELSON, H.S.; KNOETZER, J.; BUCHER, B. Effect of distance between sites and region of the body on results of skin prick tests. **J Allergy Clin Immunol**, v.97, n.2, p.596-601, 1996.
- NELSON, H.S.; ROSLONIEC, D.M.; MCCALL, L.I.; IKLE, D. Comparative performance of five commercial prick skin test devices. **J Allergy Clin Immunol**, v.92, n.5, p.750-6, 1993.
- OKAHARA, K.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, S.; YATA, N. Skin microdialysis: detection of in vivo histamine release in cutaneous allergic reactions. **Skin Pharmacol**, v.8, n.3, p.113-118, 1995.
- OSTERBALLE, O.; WEEKE, B. A new lancet for skin testing. **Allergy**, v.34, n.209-212, 1979.
- PEPYS, J. Skin testing. **Br J Hosp Med**, v.14, p.412-417, 1975.
- PERSI, L.; DEMOLY, P.; HARRIS, A.G.; TISSERAND, B.; MICHEL, F.B.; BOUSQUET, J. Comparison between nasal provocation tests and skin tests in patients treated with loratadine and cetirizine. **J Allergy Clin Immunol**, v.103, p.591-594, 1999.
- PIETTE, V.; BOURRET, E.; BOUSQUET, J.; DEMOLY, P. Prick tests to aeroallergens: is it possible simply to wipe the device between tests ? **Allergy**, v.57, p.940-942, 2002.
- PIJNENBORG, H.; NILSSON, L.; DREBORG, S. Estimation of skin prick test reactions with a scanning program. **Allergy**, v.51, n.11, p.782-788, 1996.
- PLYTYCZ, B.; SELJELID, R. From inflammation to sickness: historical perspective. **Arch Immunol Ther Exp**, v.51, n.2, p.105-109, 2003.
- POULSEN, L.K.; LIISBERG, C.; BINDSLEV-JENSEN, C.; MALLING, H.J. Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. **Clin Exp Allergy**, v.23, p.61-68, 1993.
- PUROHIT, A.; DUVERNELLE, C.; MELAC, M.; PAULI, G.; FROSSARD, N. Twenty-four hours of activity of cetirizine and fexofenadine in the skin. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.86, p.287-392, 2001.
- PUROHIT, A.; MELAC, M.; PAULI, G.; FROSSARD, N. Twenty-four hours of activity and consistency of activity of levocetirizine and desloratadine in the skin. **J Clin Pharmacol**, v.56, p.388-394, 2003.
- PUROHIT, A.; N'GOM, A.S.; DESLANDES, B.; PAULI, G.; FROSSARD, N. Similar rapid onset of action and magnitude of effect of fexofenadine and cetirizine as assessed by inhibition of histamine-induced wheal-and-flare reaction. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.93, p.562-667, 2004.
- RAO, K.S.; MENON, P.K.; HILMAN, B.C.; SEBASTIAN, C.S.; BAIRNSFATHER, L. Duration of the suppressive effect of tricyclic antidepressants on histamine-induced wheal-and-flare reactions in human skin. **J Allergy Clin Immunol**, v.82, n.5, fasc 1, p.752-757, 1988.
- ROCHES, A.D.; PARADIS, L.; BOUGEARD, Y.H.; GODARD, P.; BOUQUET, P.; CHANEZ, P. Long-term oral corticosteroid therapy does not alter the results of immediate-type allergy skin prick tests. **J Allergy Clin Immunol**, v.98, n.3, p.522-527, 1996.

- ROONGAPINUN, S.; WAJAJAMREON, S.; FOOANANT, S. Comparative efficacy of wheal-and-flare suppression among various non-sedating antihistamines and the pharmacologic insights to their efficacy. **J Med Assoc Thai**, v.87, p.551-555, 2004.
- ROSÉN, B-G.; BLUNT, L.; THOMAS, T.R. On in-vivo skin topography metrology and replication techniques. **Journal of Physics: Conference Series**, v.13, p.325-329, 2005.
- SCHLOSS, O.M. A case of allergy to common foods. **Am J Dis Child**, v.3, p.341, 1912.
- SERAFIN, W.E.; AUSREN, K.F. Current concepts: mediation of immediate hypersensitivity reactions. **N Engl J Med**, v.317, p.30, 1987.
- SIMONS, F.E.R.; SUSSMAN, G.L.; SIMONS, K.J. Effect of the H₂-antagonist cimetidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H₁-antagonists hydroxyzine and cetirizine in patients with chronic urticaria. **J Allergy Clin Immunol**, v.95, p.685-693, 1995.
- SKASSA-BROCIEK, W.; MANDERSCHIED, J.C.; MICHEL, F.B.; BOUSQUET, J. Skin test reactivity to histamine from infancy to old age. **J Allergy Clin Immunol**, v.80, n.5, p.711-716, 1987.
- SMITH, R.V. The digital camera in clinical practice. Otolaryngol. **Clin North Am**, v.35, n.6, p.1175-1189, 2002.
- SPAETH, J.; KLIMEK, L.; MOSGES, R. Sedation in allergic rhinitis is caused by the condition and not by antihistamine treatment. **Allergy**, v.51, p.893-906, 1996.
- SPECTOR, S.L. Effect of beta-adrenergic agents on skin test responses and bronchial challenge responses. **Chest**, v.73, n.6, p.976-977, 1978.
- SULLIVAN, P.W.; NICHOL, M.B. The economic impact of payer policies after the Rx-to-OTC switch of second-generation antihistamines. **Value Health**, v.7, p.402-412, 2004.
- TASHIRO, M.; HORIKAWA, E.; MOCHIZUKI, H.; SAKURADA, Y.; KATO, M. et al. Effects of fexofenadine and hydroxyzine on brake reaction time during car-driving with cellular phone use. **Hum Psychopharmacol**, v.20, p.501-509, 2005.
- TRIPATHI, A.; PATTERSON, R. Clinical interpretation of skin test results. **Immunol. Allergy Clin North Am**, v.21, n.2, p.291-300, 2001.
- VIEIRA DOS SANTOS, R.; CAVALCANTE LIMA, H. Cinética da reação cutânea induzida por puntura através de fotografia digital e termometria cutânea. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, 2007. (no prelo)
- VIEIRA DOS SANTOS, R.; TITUS, R.G.; CAVALCANTE LIMA, H. Objective evaluation of skin prick test reactions using digital photography. **Skin Res Technol**, v.13, n.2, p.148-153, 2007.
- VOHLONEN, I.; TERHO, E.O.; KOIVIKKO, A.; VANTO, T.; HOLMEN, A.; HEINONEN, O.P. Reproducibility of the skin prick test. **Allergy**, v.44, n.8, p.525-531, 1989.
- WOHRL, S.; VIGL, K.; BINDER, M.; STINGL, G.; PRINZ, M. Automated measurement of skin prick tests: an advance towards exact calculation of wheal size. **Exp Dermatol**, v.15, n.2, p.119-124, 2006.

WOOD, R.A.; PHIPATANAKUL, W.; HAMILTON, R.G.; EGGLESTON, P.A. Comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and RASTs in the diagnosis of cat allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v.103, n.5, fasc. 1, p.773-779, 1999.

ZUBERBIER, T.; BINDSLEV-JENSEN, C.; CANONICA, W.; GRATTAN, C.E.H.; GREAVES, M.W. et al. EAACI / GA2LEN / EDF guideline: management of urticaria. **Allergy**, v.61, p.321-331, 2006.

ANEXO 1
DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS

2ª VIA

Curitiba, 14 de agosto de 2003.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Rosaly Vieira dos Santos
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA PÁPULA E DO ERITEMA POR FOTOGRAFIA DIGITAL E DO CALOR POR TERMOMETRIA CUTÂNEA, INDUZIDOS POR HISTAMINA E AEROALÉRGENOS MODIFICADOS POR ANTI-HISTAMÍNICOS", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 29 de julho de 2003, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Protocolo CEP/HC 689.108/2003-07.

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 14 de fevereiro de 2004.

Atenciosamente,

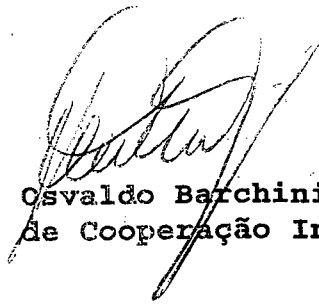


Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

A QUEM INTERESSAR POSSA

Declaramos para os devidos fins, que ROSALY VIEIRA DOS SANTOS foi bolsista da CAPES, no período de 04/2006 a 03/2007 na CHARITÉ CAMPUS MITTE- ALEMANHA, onde realizou Doutorado Sandwich em MEDICINA.

Brasília, 03/04/2007



Leonardo Osvaldo Barchini Rosa
Coordenador Geral de Cooperação Internacional

KLINIK FÜR DERMATOLOGIE,
VENEROLOGIE UND ALLERGOLOGIE
Direktor: Prof. Dr. med. W. Szalay



Klinik mit zertifiziertem
Qualitätsmanagementssystem nach
DIN EN ISO 9001:2000

ALLERGIE-CENTRUM CHARITÉ
Prof. Dr. med. T. Zuberbier

ECARF

Bestimmte
Charité für
Allergien
Spezialambulanz

Spezialambulanz für Urtikaria, Neurodermitis, Angioödem und Insektenstiche
Prof. Dr. med. M. Maurer

Tel. +49 30 453 518 642
Fax +49 30 453 518 672
mailto:maurer@charite.de
www.allergie-centrum-charite.de
www.ecarf.org

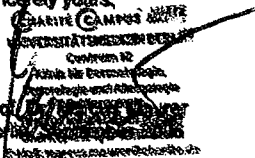
Certificate

Re: Volumetric and thermographic assessment of the influence of skin nerves on allergic reactions to pricktesting

Dear Sir or Madam,

Herewith, we grant permission to perform investigations of the size, kinetics and quality of skin prick test reactions including volumetric and thermographic assessments in skin areas pretreated with local anesthetics or vehicle ointment in up to 100 allergic patients treated in the outpatient clinic of the Department of Dermatology and Allergy of the Charité - Universitätsmedizin Berlin

Sincerely yours,


CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie
Prof. Dr. med. T. Zuberbier
Berlin
E-Mail: toaer@charite.de

CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Standort Charitéplatz 1 | 10117 Berlin | Telefon +49 30 453 518 058 | www.allergie-centrum-charite.de

ANEXO 2
ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE

Suppression of histamine- and allergen-induced skin reactions: comparison of first- and second-generation antihistamines

Rosalva Vieira dos Santos, MD*†; Markus Magerl, MD*; Agnieszka Mlynek, MD*; and Hermenio C. Lima, MD†

Background: Nonsedating antihistamines (nsAHs) are recommended as first-line therapeutics for the treatment of mast cell–driven disorders, including allergic rhinitis and urticaria. However, their superiority over first-generation AHs (fgAHs) has recently been called into question, mainly because of the lack of supporting head-to-head therapeutic studies.

Objective: To compare the effects of 3 modern nsAHs with those of the fgAH hydroxyzine on histamine- and allergen-induced skin reactions in a controlled, double-blind, clinical trial.

Methods: Skin prick tests with histamine and *Dermatophagoides pteronyssinus* extract were performed before and 4 hours after treatment with hydroxyzine, 25 mg; desloratadine, 5 mg; epinastine, 20 mg; fexofenadine, 120 mg; or placebo. Wheal and erythema development was evaluated by digital photography and planimetric analyses.

Results: The nsAHs prevented the development of positive reactions to histamine in only 10% to 20% of all individuals tested (n = 75). In contrast, more than 50% of all hydroxyzine-treated individuals showed negative test reactions to histamine (ie, wheals <7 mm² in area or <3 mm in diameter). Similar differences, although less pronounced, were detected when comparing the effects of nsAHs with hydroxyzine on *D pteronyssinus* prick testing in a limited number of *D pteronyssinus*–sensitized individuals.

Conclusions: These results indicate that hydroxyzine is more effective than nsAHs when given as recommended in suppressing histamine-induced or allergic skin reactions. Our results suggest that higher doses of nsAHs than those currently recommended are required for the treatment of skin responses to obtain antihistaminic and antiallergic effects that are equivalent to those of fgAHs.

Ann Allergy Asthma Immunol. 2009;102:495–499.

INTRODUCTION

Antihistamines (AHs) are first-choice drugs in the treatment of allergic disorders, including allergic rhinitis (AR) and other mast cell–mediated diseases such as chronic urticaria or mastocytosis. Current treatment guidelines for these diseases recommend the use of second-generation nonsedating AHs (nsAHs).^{1,2} These recommendations are based on the fact that nsAHs have been shown to be effective and safe in the treatment of AR, chronic urticaria, and mastocytosis.^{3,4} The nsAHs are also to be preferred to older first-generation AHs (fgAHs) because they have less sedative effects.⁵

However, fgAHs are still widely used for the treatment of histamine-driven diseases. This is most likely because of any one or a combination of the following reasons: (1) fgAHs

are usually available without prescription and are cheaper than nsAHs, which are not reimbursed by medical insurance in some countries⁶; (2) patients and physicians are familiar with fgAHs and, therefore, reluctant to switch to novel compounds they are not experienced with using⁷; (3) the safety profiles of fgAHs are well characterized because of their frequent use for more than 4 decades⁸; and (4) fgAHs are frequently considered to exhibit better antihistaminic effects compared with nsAHs. The latter assumption appears to be widely accepted despite contradicting literature.^{9,10,11}

Therefore, we have performed a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind, and parallel-group designed study to compare the efficacy of nsAHs (desloratadine, epinastine, and fexofenadine) with that of the fgAH hydroxyzine in reducing histamine- or allergen-induced wheal-and-flare responses. Our results reveal that nsAHs given at recommended daily doses are less effective than hydroxyzine in suppressing skin reactions to histamine or allergen prick testing in a 4-hour time point analysis.

METHODS

Design

This study was performed as an interventional, double-blind, placebo-controlled, parallel-group clinical trial comparing the

Affiliations: * Department of Dermatology and Allergy, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany; † Clinical Immunology and Allergy Division, Clinical Pathology Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Disclosures: Authors have nothing to disclose.

Funding Sources: This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Dr Vieira dos Santos).

Drs dos Santos and Magerl contributed equally to this study.

Received for publication July 30, 2008; Received in revised form January 20, 2009; Accepted for publication January 22, 2009.

effects of first- with second-generation AHs on histamine and *Dermatophagoides pteronyssinus*-induced skin reactions. The study protocol was approved by the local research ethics committee, and all participants provided signed informed consent.

Participants

Seventy-five consecutive volunteers (students or employees from Curitiba University Hospital, Curitiba, Brazil) were included in this study (age range, 19–61 years; mean [SD] age, 28.8 [8.9] years; 42 women). None of them had been treated with AHs, mast cell stabilizers, or corticosteroids during the 2 weeks before testing. Individuals receiving immunotherapy or experiencing dermatological diseases at the test area were excluded.

Clinical Trial

The participants were stratified in 5 equal groups (15 volunteers each) and received a single-dose oral treatment (tablet) with hydroxyzine, 25 mg (commercial preparation), an nsAH (fexofenadine, 120 mg; epinastine, 20 mg; or desloratadine, 5 mg [all commercial preparations]), or placebo 4 hours before testing. The AH doses were chosen according to the manufacturers' recommendation and the current guidelines on the treatment of AR and urticaria.¹ The placebo was a white 25-mg tablet containing lactose.

Skin Prick Tests

Skin prick tests with histamine, *D pteronyssinus*, and sterile saline were performed before and 4 hours after AH or placebo treatment, as previously described.¹² Briefly, 1 drop of histamine, 10 mg/mL (IPI-ASAC, São Paulo, Brazil); *D pteronyssinus* extract, 113 kU/mL (IPI-ASAC); and saline solution (IPI-ASAC) were applied on the left forearm anterior surface. Sterile 26-gauge needles were used in all prick tests. Test results were evaluated after 10 minutes by digital photography and planimetric analysis. Test reactions that showed a wheal of 3 mm or more in diameter or 7 mm² or more in area (erythema, ≥ 10 mm in diameter or ≥ 80 mm² in area) were considered positive.^{13,14}

Evaluation of Test Reaction

Images of test reactions were obtained using a digital camera (Olympus 650°C; Olympus Corporation, Tokyo, Japan), and further analyses were performed using Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Inc, San Jose, California), as previously described.¹² Briefly, the image areas that showed wheals or erythema were highlighted by the use of distinct filter masks, and diameters and areas were evaluated using the Adobe Photoshop 6.0 measuring tool. The results are expressed as means (SDs). For planimetric analysis, a ruler was used to measure the longest and the midpoint orthogonal diameter of the wheal and the erythema reaction, and the mean diameter was calculated. All data were analyzed using the Pearson χ^2 test. $P < .05$ was considered to indicate differences of statistical significance.

RESULTS

Suppression of Histamine-Induced Skin Reactions in Most Individuals Treated With Hydroxyzine

Fexofenadine, epinastine, and desloratadine, given at recommended daily doses, prevented positive prick test reactions to histamine¹³ in only 10% to 20% of all 75 individuals tested, as evaluated by digital photography (Fig 1A). In contrast, more than 50% of all hydroxyzine-treated individuals showed negative prick test reactions to histamine. As seen in Figure 1B, virtually identical results were obtained using planimetric analyses to detect positive (ie, ≥ 3 mm in diameter) skin reactions to histamine.

In addition, the rates of responders to AH treatment correlated well with wheal size suppression in the different treatment groups. The maximum suppression was seen in hydroxyzine-treated individuals (75% reduction for histamine and 57% reduction for allergen). All 3 nsAH treatment groups showed less reduction in the size of histamine-induced wheal reactions (ie, 32%, 55%, and 58% suppression in individuals treated with desloratadine, epinastine, and fexofenadine, respectively).

Similar differences, although less pronounced, were detected comparing the erythema size of skin test reactions to histamine in AH-treated individuals (Fig 1C and D). Hydroxyzine treatment prevented the development of positive test reactions in 60% of all individuals tested (Fig 1C). In contrast, nsAH treatment prevented positive erythema reactions in only 8% (desloratadine), 24% (epinastine), and 40% (fexofenadine) of individuals tested. Assessing erythema sizes by digital photography and traditional planimetric analysis yielded essentially equivalent results (Fig 1D).

Suppression of Prick Test Reactions to Allergen in Most Individuals Treated With Daily Recommended Doses of Hydroxyzine

To evaluate whether nsAHs and hydroxyzine are also different in their efficacy to suppress skin reactions induced by allergen, we performed a pilot study and evaluated AH effects on skin prick test reactions to *D pteronyssinus* in sensitized individuals (31 of 75 individuals) treated with placebo, hydroxyzine, or nsAHs as done previously. We found that nsAHs prevented the development of positive wheal and erythema reactions to prick testing in only half or less of all patients treated (Table 1). In contrast, up to 70% of all hydroxyzine-treated individuals showed negative test reaction results to skin prick testing as evaluated by digital photography or planimetric analyses of wheal-and-flare reactions (Table 1).

DISCUSSION

In the present study, the fgAH hydroxyzine was compared with desloratadine, epinastine, and fexofenadine, 3 modern nsAHs. We found that all of the nsAHs were less effective than hydroxyzine in preventing histamine- and allergen-induced wheal-and-flare responses when given at recommended doses. To our knowledge, this is the first study that

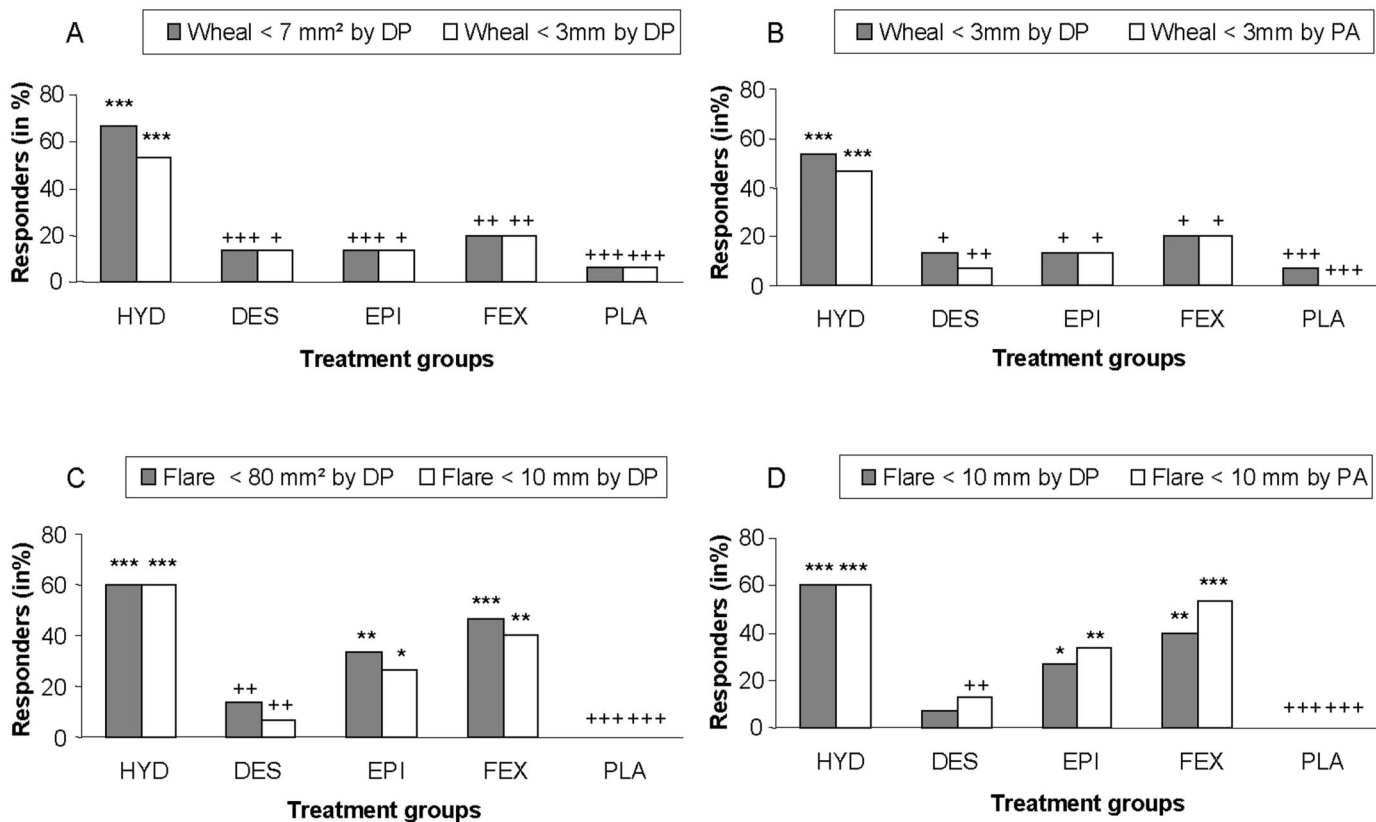


Figure 1. Hydroxyzine (HYD), but not desloratadine (DES), epinastine (EPI), or fexofenadine (FEX), suppresses positive skin reactions to histamine prick testing in most of the individuals treated. A and B, Reduction in positive skin test reactions to histamine prick testing as assessed by measuring wheals (A, digital photography [DP] area and diameter; B, DP and planimetric analysis [PA] diameter). C and D, Reduction in positive reactions to histamine prick testing as assessed by measuring erythema (C, DP area and diameter; D, DP and PA diameter). * $P < .05$ vs placebo, ** $P < .01$ vs placebo, *** $P < .001$ vs placebo, + $P < .05$ vs hydroxyzine, ++ $P < .01$ vs hydroxyzine, and +++ $P < .001$ vs hydroxyzine. The doses of medications given were as follows: HYD, 25 mg; DES, 5 mg; EPI, 20 mg; and FEX, 120 mg.

Table 1. Rates of Responders to *Dermatophagoides pteronyssinus* Skin Prick Testing After Antihistamine Treatment^a

Treatment	Wheal			Erythema		
	Area by DP <7 mm ²	Diameter by PA <3 mm	Diameter by DP <3 mm	Area by PA <80 mm ²	Diameter by PA <10 mm	Diameter by DP <10 mm
Hydroxyzine, 25 mg (n=7)	5 ^b	4 ^c	4 ^c	5 ^b	4 ^c	4 ^c
Desloratadine, 5 mg (n=6)	1 ^d	0 ^c	1 ^d	1 ^d	0 ^d	1
Epinastine, 20 mg (n=6)	3	2	3	3 ^d	2	3 ^c
Fexofenadine, 120 mg (n=6)	2	2	3	2	2	3 ^c
Placebo (n=6)	0 ^e	0 ^d	0 ^d	0 ^e	0 ^d	0 ^d

Abbreviations: DP, digital photography; PA, planimetric analysis.

^a Data are given as number of responders treated with each drug. Data are given for only subjects sensitized to *D pteronyssinus* (n=31).

^b $P < .01$ vs placebo.

^c $P < .05$ vs placebo.

^d $P < .05$ vs hydroxyzine.

^e $P < .01$ vs hydroxyzine.

compares the efficacy of fgAHs with that of nsAHs by histamine or allergen skin prick testing.

The extent of histamine-induced wheal suppression by hydroxyzine and the nsAHs tested was similar to that reported in the literature. Placebo treatment resulted in no or minimal suppression of responses,^{15–21} whereas hydroxyzine was an effective suppressor.²² Desloratadine,¹⁶ fexofenadine, and epinastine¹⁷ exhibited intermediate potencies in suppressing histamine wheal responses.

Interestingly, to our knowledge, none of the AHs used in our study has been tested previously for suppressive effects on allergen prick test–induced wheal responses. However, hydroxyzine and fexofenadine have been evaluated for suppression of wheal responses induced by intradermal injection. Interestingly, these studies reported suppressive effects that were similar to those observed for hydroxyzine and fexofenadine in our study. For example, hydroxyzine, 25 mg, treatment resulted in 57% suppression of allergen-induced wheals in our study (prick testing) compared with 63% suppression reported by Cook and coworkers (intradermal testing).²³ Hydroxyzine's metabolite levocetirizine (the R enantiomer of the cetirizine racemate) has been compared with loratadine and desloratadine. Levocetirizine provided significantly greater inhibition of the histamine-induced wheal at 2 hours after administration of desloratadine.²⁴ Similar results were seen in a study comparing the effects of levocetirizine and loratadine on histamine-induced skin reactions. Flare, wheal, and itch were potently inhibited by levocetirizine, with an efficacy that exceeded that of loratadine.²⁵

Digital photography has previously been used for assessing skin prick test responses.¹² The results presented herein confirm that the use of this technique yields essentially identical results as obtained by classic macroscopic planimetric analyses. Thus, digital photography is a simple and valid method for evaluating skin prick test responses, especially in clinical trial settings, where it may be helpful to minimize interobserver differences in obtaining test results.¹²

The potency of individual AHs in suppressing histamine- and allergen-induced wheal responses cannot be directly extrapolated to their specific efficacy in the treatment of all histamine-driven conditions.²⁶ However, our findings indicate that nsAHs given at recommended doses are generally less effective than the fgAH hydroxyzine in preventing skin reactions to histamine and allergen prick testing. This suggests that nsAHs may also be less effective than fgAHs when given at recommended doses for the treatment of histamine-dependent dermatoses. This hypothesis, however, awaits confirmation, because there are no head-to-head studies, as of yet, comparing nsAH with fgAHs in, for example, urticaria.

Taken together, our findings demonstrate that hydroxyzine is a more potent inhibitor of skin prick test reactions induced by histamine and *D pteronyssinus* than desloratadine, epinastine, and fexofenadine, which suggests that daily recommended doses of hydroxyzine and nsAHs are not bioequivalent in suppressing histamine-mediated cutaneous inflammation.

REFERENCES

1. Zuberbier T, Bindslev-Jensen C, Canonica W, et al. EAACI/GA2LEN/EDF guideline: management of urticaria. *Allergy*. 2006;61:321–331.
2. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Bachert C, et al. Requirements for medications commonly used in the treatment of allergic rhinitis: European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). *Allergy*. 2003;58:192–197.
3. Lee DK, Gardiner M, Haggart K, Fujihara S, Lipworth BJ. Comparative effects of desloratadine, fexofenadine, and levocetirizine on nasal adenosine monophosphate challenge in patients with perennial allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:650–653.
4. Handa S, Dogra S, Kumar B. Comparative efficacy of cetirizine and fexofenadine in the treatment of chronic idiopathic urticaria. *J Dermatol Treat*. 2004;15:55–57.
5. Tashiro M, Horikawa E, Mochizuki H, et al. Effects of fexofenadine and hydroxyzine on brake reaction time during car-driving with cellular phone use. *Hum Psychopharmacol*. 2005;20:501–509.
6. Sullivan PW, Nichol MB. The economic impact of payer policies after the Rx-to-OTC switch of second-generation antihistamines. *Value Health*. 2004;7:402–412.
7. Cipher DJ, Hooker RS, Guerra P. Prescribing trends by nurse practitioners and physician assistants in the United States. *J Am Acad Nurse Pract*. 2006;18:291–296.
8. Spaeth J, Klimek L, Mosges R. Sedation in allergic rhinitis is caused by the condition and not by antihistamine treatment. *Allergy*. 1996;51:893–906.
9. Morgan MM, Khan DA, Nathan RA. Treatment for allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria: focus on oral antihistamines. *Ann Pharmacother*. 2005;39:2056–2064.
10. Greaves MW. Antihistamines in dermatology. *Skin Pharmacol Physiol*. 2005;18:220–229.
11. Kalivas J, Breneman D, Tharp M, Bruce S, Bighy M. Urticaria: clinical efficacy of cetirizine in comparison with hydroxyzine and placebo. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;86:1024–1028.
12. dos Santos RV, Titus RG, Lima HC. Objective evaluation of skin prick test reactions using digital photography. *Skin Res Technol*. 2007;13:148–153.
13. Dreborg S. Histamine reactivity of the skin. *Allergy*. 2001;56:359–364.
14. Poulsen LK, Liisberg C, Bindslev-Jensen C, Malling HJ. Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. *Clin Exp Allergy*. 1993;23:61–68.
15. Purohit A, Duvernelle C, Melac M, Pauli G, Frossard N. Twenty-four hours of activity of cetirizine and fexofenadine in the skin. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;86:287–392.
16. Purohit A, Melac M, Pauli G, Frossard N. Twenty-four hours of activity and consistency of activity of levocetirizine and desloratadine in the skin. *J Clin Pharmacol*. 2003;56:388–394.
17. Grant JA, Danielson L, Rihoux JP, DeVos C. A double-blind, single-dose, crossover comparison of cetirizine, ebastine, epinastine, fexofenadine, terfenadine, and loratadine versus placebo: suppression of histamine-induced wheal and flare response for 24 h in healthy male subjects. *Allergy*. 1999;54:700–707.
18. Goetz DW, Jacobson JM, Apaliski SJ, Kepperger DW, Martin ME. Objective antihistamine side effects are mitigated by evening dosing of hydroxyzine. *Ann Allergy*. 1991;67:448–454.
19. Roongapinun S, Wajajamreong S, Foonant S. Comparative efficacy of wheal-and-flare suppression among various non-sedating antihistamines and the pharmacologic insights to their efficacy. *J Med Assoc Thai*. 2004;87:551–555.
20. Purohit A, N'Gom AS, Deslandes B, Pauli G, Frossard N. Similar rapid onset of action and magnitude of effect of fexofenadine and cetirizine as assessed by inhibition of histamine-induced wheal-and-flare reaction. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;93:562–567.
21. Kaliner MA, White MV, Economides A, et al. Relative potency of fexofenadine HCL 180 mg, loratadine 10 mg, and placebo using a skin test model of wheal-and-flare suppression. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;90:629–634.

-
22. Simons FER, Sussman GL, Simons KJ. Effect of the H₂-antagonist cimetidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H₁-antagonists hydroxyzine and cetirizine in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:685–693.
23. Cook TJ, MacQueen DM, Wittig HJ, Thornby JI, Lantos RL, Virtue CM. Degree and duration of skin test suppression and side effects with antihistamines: a double blind controlled study with five antihistamines. *J Allergy Clin Immunol*. 1973;51:71–77.
24. Passalacqua G, Guerra L, Compalati E, et al. Comparison of the effects in the nose and skin of a single dose of desloratadine and levocetirizine over 24 hours. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:143–147.
25. Clough GF, Boutsiouki P, Church MK. Comparison of the effects of levocetirizine and loratadine on histamine-induced wheal, flare, and itch in human skin. *Allergy*. 2001;56:985–988.
26. Persi L, Demoly P, Harris AG, et al. Comparison between nasal provocation tests and skin tests in patients treated with loratadine and cetirizine. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:591–594.

Requests for reprints should be addressed to:
Rosaly Vieira dos Santos, MD
Department of Dermatology and Allergy
Allergie-Centrum-Charité
Charité–Universitätsmedizin Berlin
Charitéplatz 1
10117 Berlin, Germany
E-mail: rosaly.vieira-dos-santos@charite.de

Answers to CME examination—*Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, June 2009 Letz AG, Calabria CW: T-cell epitopes of aeroallergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009;102:445–452.

1. b
2. d
3. a
4. c
5. e

Beyond flat weals: validation of a three-dimensional imaging technology that will improve skin allergy research

R. V. dos Santos,*† A. Mlynek,* H. C. Lima,‡ P. Martus§ and M. Maurer*

*Department of Dermatology and Allergy and §Department of Biostatistics, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany; †Department of Paediatrics and ‡Clinical Pathology Department, Clinical Immunology and Allergy Division, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

doi:10.1111/j.1365-2230.2008.02897.x

Summary

Skin-prick tests (SPTs) are a standard way to test for sensitizations to allergens, but to date, techniques that allow for high-quality measurements of the resulting weals for research purposes are lacking. In this study, we assessed a new three-dimensional (3D) imaging technology for its accuracy and consistency. We found that this new technology showed very little intraoperator and interoperator variation for repeated measurements of a model of known area by each of two operators. We also found that repeated measurements of the same object over 4 months showed virtually no variation. Finally, 3D imaging was superior to traditional ruler measurements for assessing SPT reactions to histamine and allergen. For high-quality measurements of SPT reactions, 3D imaging is accurate, consistent and reliable.

Skin-prick tests (SPTs) are widely used to determine if people have allergies. In positive SPTs, a drop of allergen extract introduced into the test subject's skin results in a weal-and-flare reaction. However, to date, high-quality measurements of these weals for research purposes have been virtually impossible to obtain. The two methods currently in use for measuring weals are absurdly subjective. In the traditional method,¹ the investigator uses an ordinary, transparent plastic ruler to make an approximate measurement of weal diameter. In the more 'high-technology' method,² the investigator uses a pen to trace the border of the weal on the patient's skin, then uses clear adhesive tape to transfer this marking onto a sheet of paper, which is finally run through a photocopy machine to fix the record for analysis. The traditional method cannot archive raw imagery and the tape-transfer method is time-consuming;³ both methods are imprecise, inconsistent, and worst of all, two-dimensional.

Although sufficient for routine clinical examinations, these methods are inadequate for many research purposes.⁴

Three-dimensional (3D) imaging is a new measuring method in medicine. It uses optical projections, a high-resolution video camera, and computer software to rapidly generate images and measurements of skin topography (Fig. 1). The method has been used successfully in wound care,⁵ orthodontic surgery,⁶ and dermatological laser treatments,⁷ and its fundamental physics have been validated.⁸ The aim of the present study was to assess the accuracy and reliability of a 3D imaging device for measuring weals.

Report

3D imaging was performed using a commercial system (PRIMOS 5.075D; GFM, Teltow, Germany),⁵ which automatically determines size parameters. Firstly, a model of known area was measured by two operators, 10 times each. Coefficients of variation (CV) were calculated for intraoperator variability ($SD \times 100/\text{mean}$) and interoperator variability (difference in two operator means $\times 100/\text{overall mean}$). Secondly, the machine's calibration system was used to measure an object of known dimensions three times during the

Correspondence: Professor Dr Marcus Maurer, Department of Dermatology and Allergy, Allergie-Centrum-Charité, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany.
E-mail: marcus.maurer@charite.de

Conflict of interest: none declared.

Accepted for publication 1 February 2008

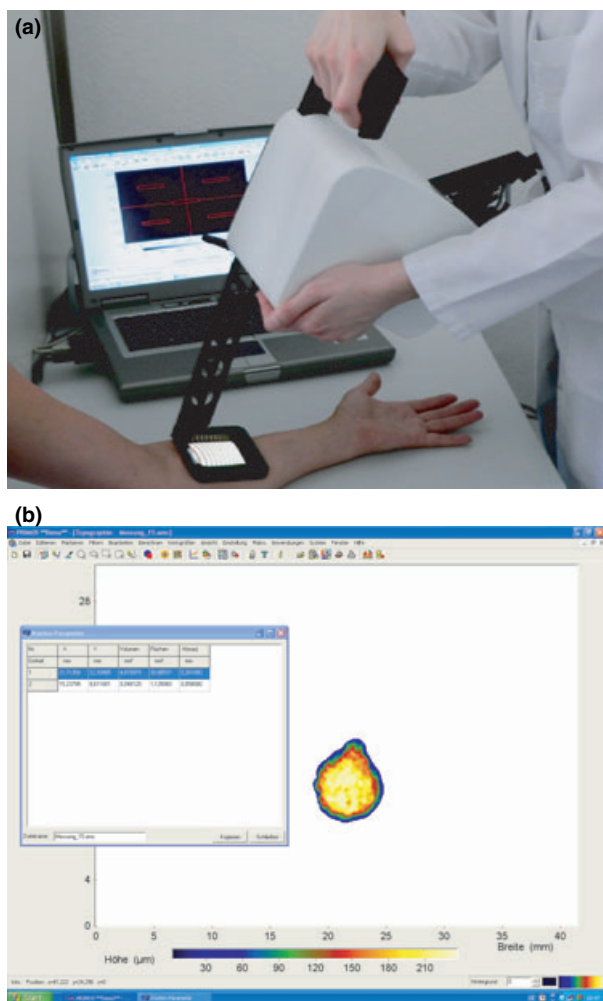


Figure 1 The three-dimensional imaging system. (a) PRIMOS 5.075 system used in this study; (b) screenshot of data analysis of a weal.

4-month study period, in order to test the system's inherent long-term consistency. Thirdly, SPTs with histamine (10 mg/mL) and *Dermatophagoides pteronyssinus* extract were performed on 10 subjects, 5 of whom had a positive history of allergic rhinitis. Weals were measured by the traditional ruler method and by 3D imaging, at 5, 10, 15, 20, and 30 min after the SPTs, by two operators. The interoperator CV for weal area was calculated for each measurement device at each timepoint. Descriptive statistics were used to calculate means and SEMs of the measurements, and a paired Student's *t*-test was used to compare the 3D imaging measurements with the ruler measurements. Significance was set at $P \leq 0.05$.

The 3D imaging measurements of a model of 50.27 mm² in area performed by two operators yielded means \pm SD of 49.92 \pm 0.20 and 49.90 \pm 0.16. This

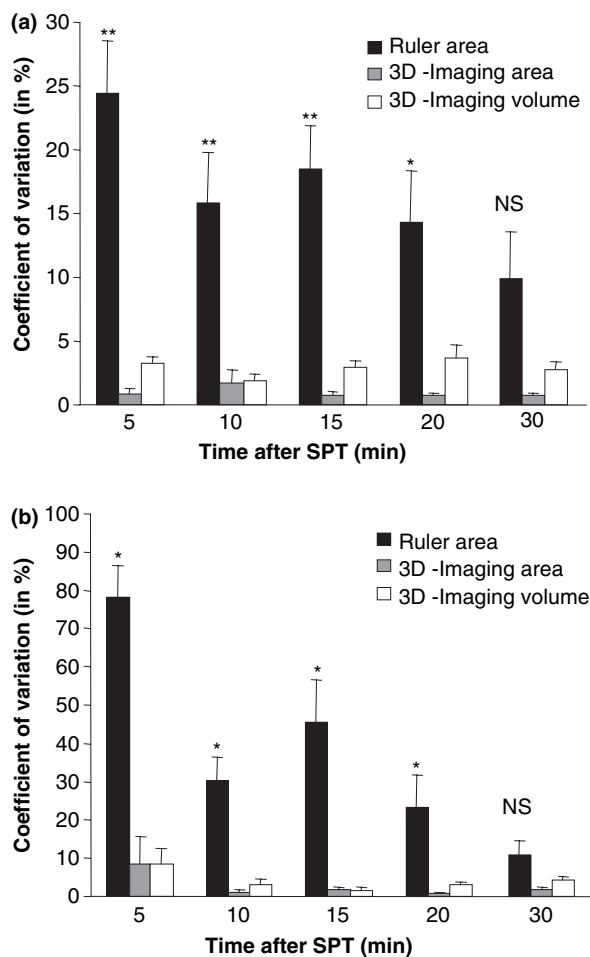


Figure 2 Interoperator variability of skin-prick test weal measurement by two methods. Interoperator coefficient of variation (CV) of area [traditional ruler method or for the new three-dimensional (3D) imaging method] or volume (3D imaging method only), at the five measurement timepoints. (a) Histamine-induced weals (CV is based on 10 weal measurements per timepoint per operator); (b) allergen-induced weals (CV is based on 5 weal measurements per timepoint per operator). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Error bars may be smaller than the true error, due to partial dependency of the data.

difference between true and measured size would be imperceptible to the human eye. The mean intraoperator CV was 0.74% for volume and 0.37% for area; the mean interoperator CV was 0.75% for volume and 0.37% for area, thus showing much higher reproducibility than a comparable previous report⁴ of the aforementioned method of measuring outlines drawn by pen (intraoperator area CV 1.4%, interoperator area CV 2.3%). The three calibration measurements were all virtually identical, showing that the device remained consistent over time. All 10 volunteers (6 men, 4 women; mean \pm SD age 28.6 \pm 3.6 years) presented

positive reactions (defined as weals $\geq 7 \text{ mm}^2$) for histamine and 5 presented weals for *D. pteronyssinus*, at all five timepoints, for a total of 150 images (75 per operator). The interoperator variability was far worse for the traditional ruler method than for the 3D imaging (Fig. 2). As the figure illustrates, the ruler method was unable to measure the height and volume of weals, whereas the 3D imaging method did so with very low variability. In summary, we found that the 3D imaging method works reliably, generates accurate and consistent data, and enables archiving of high-quality 3D imagery.

In our experience, this 3D imaging device was quick and easy to use. The operator simply asks the subject to place the arm underneath the scanner, and with a few computer clicks, all the data and raw imagery are available. The device was not difficult to operate, and we believe that any medical assistant who uses a computer could be quickly trained to take weal measurements with this device. Thus the only real barrier to its adoption for routine clinical practice is the initial purchase price, which would be difficult to justify for only sporadic routine patient care in an office. However, at large busy hospitals, the cost of the device might be offset by savings from personnel efficiency, because a dedicated technician could quickly and semiautomatically gather and analyse recordings from dozens of patients consecutively.

This 3D imaging technique has many advantages over conventional methods for weal measurement in research. Its readings are simple to obtain, and are highly standardized and objective. Unlike traditional methods, the device not only measures the area of a weal, but creates a high-resolution 3D topographical map of the entire weal (Fig. 3). Digital photography of the erythema is automatically obtained at the same time and position, thus enabling a better understanding of the relationship between weal and erythema.⁹

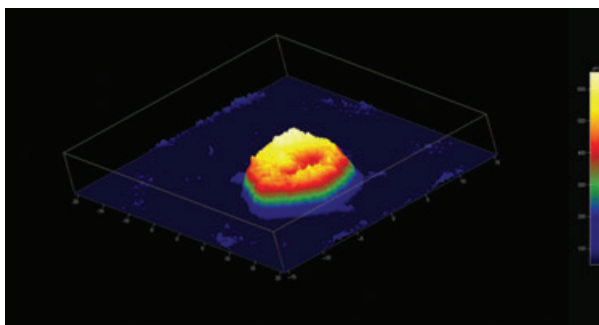


Figure 3 Three-dimensional topographical map of a weal from an allergen-induced skin-prick test.

The images can be digitally archived, thus permitting documentation of the SPT and interpretation in other study centres, even years later, all of which is essential for long-term or epidemiological studies.¹⁰

Furthermore, 3D imaging enables researchers to address important questions in allergy research that conventional methods cannot. The method: (i) can compare the diameters and volumes of weals, possibly revealing that weals with the same diameter have significantly different volumes and thus different intensities of allergic reaction; (ii) allows micro-anatomical studies of weal borders and extravasation, which enables assessment of the different underlying modes of action of weal-inducing substances; (iii) allows analysis of weal volume, which might serve as a more accurate measure of allergic sensitization than measuring IgE levels, thus experimental studies are needed to explore this; (iv) enables research of the 'tumour' aspect of skin inflammation; (v) provides an objective and numerically quantitative assessment of reactions in patch tests among others, which up to now have been too subjective and semiquantitative for reliable research; and (vi) can record several images per minute, thus enabling research into the local kinetics of allergens and remedies.⁷ With time and further reflection, new uses for 3D imaging will arise.

In conclusion, we found that 3D imaging provides accurate and consistent measurement of weals. It quickly records, analyses and archives both imagery and numerical data. We believe that the usefulness of 3D imaging for dermatology research should be explored further.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) to R. Vieira dos Santos. We thank Dr M. Hanna (Medical Manuscript Service) for providing publishing advice and medical writing services, and J. Urcioli for proofreading the manuscript.

References

- 1 Aas K. Clinical and experimental aspects of standardization and purification of allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975; **49**: 44–54.
- 2 Ownby DR. Computerized measurement of allergen-induced skin reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1982; **69**: 536–8.

- 3 Wöhrl S, Vigl K, Binder M *et al.* Automated measurement of skin prick tests: an advance towards exact calculation of wheal size. *Exp Dermatol* 2006; **15**: 119–24.
- 4 Pijnenborg H, Nilsson L, Dreborg S. Estimation of skin prick test reactions with a scanning program. *Allergy* 1996; **51**: 782–8.
- 5 Roques C, Téot L, Frasson N, Meaume S. PRIMOS: an optical system that produces three-dimensional measurements of skin surfaces. *J Wound Care* 2003; **12**: 362–4.
- 6 Hajeer MY, Mao Z, Millett DT *et al.* A new three-dimensional method of assessing facial volumetric changes after orthognathic treatment. *Cleft Palate Craniofac J* 2005; **42**: 113–20.
- 7 Friedman PM, Skover GR, Payonk G *et al.* 3D in-vivo optical skin imaging for topographical quantitative assessment of non-ablative laser technology. *Dermatol Surg* 2002; **28**: 199–204.
- 8 Rosén B-G, Blunt L, Thomas TR. On in-vivo skin topography metrology and replication techniques. *J Phys Conf Series* 2005; **13**: 325–9.
- 9 Dos Santos RV, Titus RG, Lima HC. Objective evaluation of skin prick test reactions using digital photography. *Skin Res Technol* 2007; **13**: 148–53.
- 10 Illi S, Garcia-Marcos L, Hernando V *et al.* Reproducibility of skin prick test results in epidemiologic studies: a comparison of two devices. *Allergy* 1998; **53**: 353–8.