

Cinética da reação cutânea induzida por puntura através de fotografia digital e termometria cutânea

Kinetic of skin prick test reaction using digital photography and skin infrared thermography.

Rosaly Vieira dos Santos¹, Hermênio C. Lima²

Resumo

Objetivo: Demonstrar e comparar a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea *in vivo*: eritema, pápula e temperatura.

Métodos: Estudo experimental. Foi determinada a velocidade das variáveis da reação cutânea induzida por histamina e *Dermatophagoides pteronyssinus* na face anterior do antebraço de voluntários, aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. Uso de anti-histamínico foi critério de exclusão. O tamanho da pápula, e o tamanho e a intensidade do eritema foram determinados pela análise das imagens em fotografia digital. Filmou-se o local do teste cutâneo durante 20 minutos com câmera infravermelha de alta sensibilidade, em ambiente a 19°C, sem corrente de ar. Os dados foram analisados em *software* específico. Todos os dados foram transformados por um fator de unidade no 10º minuto de cada grandeza. Determinou-se em cada ponto a tangente da curva de intensidade unitária e dividiu-se cada resultado pelo tempo entre cada ponto específico. Resultados da velocidade foram expressos em unidade \pm erro padrão.

Resultados: Não houve diferença na cinética da reação entre os desafios. Nos primeiros três minutos a intensidade do eritema atingiu velocidade máxima, com diferença significativa em relação à pápula e à temperatura. A pápula obteve velocidade maior entre o 5º e o 10º minuto em relação ao eritema.

Conclusões: Termometria cutânea e fotografia digital são métodos objetivos de leitura do teste cutâneo por puntura; incorporam novas variáveis nos testes cutâneos e no diagnóstico de doenças alérgicas mediadas por IgE e determinam a cinética do desenvolvimento da reação cutânea refletindo a reação tríplice de Lewis.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(3):87-93 termometria, teste cutâneo, puntura, histamina, *Dermatophagoides pteronyssinus*

Abstract

Objective: To demonstrate the kinetic of skin prick test reaction *in vivo*: erythema, wheal, and temperature.

Methods: Histamine and *D. pteronyssinus* extract was used in volunteers. The camera was held at a fixed distance and digital photos of skin reaction were obtained at 0, 3, 5, 10, 15 and 20 min. The wheal, erythema size and the intensity of the erythema were determined by Adobe Photoshop 6.0®. The infrared camera was used to film for 20 min in the place of prick test. The data were analyzed by TermaCam® 2000 software. All the data obtained were transformed in the same unity. The tangent was determinate in each point and divided by time to obtain the speed of each parameter development. The velocity is shown in unity / min \pm standardized error.

Results: There was not difference of kinetic reaction of each inflammatory parameter observed induced by histamine or *D. pteronyssinus* extract. As overall, the erythema size and intensity developed first followed by the increase in the temperature and wheal. The erythema intensity and size presented the maximal velocity in the first 3 minutes. However, the wheal and temperature obtained the maximal between 5 and 10 minutes.

Conclusions: The skin infrared thermometry and digital photography are objective methods to evaluate the skin prick test. They are able to determine the kinetic of this reaction induced by antigen or histamine representing graphically the Lewis' triple reaction. It was created the new parameter of skin reaction that may be important in future studies.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2007; 30(3):87-93 termography, skin test, prick test, histamine, *Dermatophagoides pteronyssinus*

1. Médica Alergista, Mestre e Doutoranda em Ciências Médicas pela Universidade Federal do Paraná;
2. Médico Alergista, Imunologista Clínico e Dermatologista, Professor Adjunto do Departamento de Patologia Médica, Chefe da Disciplina de Imunologia Clínica da Universidade Federal do Paraná, Coordenador do Núcleo de Pesquisas em Imunodermatologia e Imunologia Clínica da UFPR.

Artigo submetido em 06.02.2007, aceito em 24.04.2007.

Introdução

Os sinais inflamatórios caracterizam-se por dor, rubor, calor e tumor, já descritos por Celsius no primeiro século da era cristã. Na metade do século XIX, Virchow adicionou "perda de função" aos sinais da inflamação¹.

A reação cutânea induzida pelo teste de puntura apresenta características de inflamação. Observa-se inicialmente a reatividade vascular (eritema) após a introdução de histamina ou antígeno 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 no aumento da temperatura e do edema local (pápula), no eritema reflexo ao redor da pápula e no prurido. Tudo isso, em conjunto, forma os sinais cardinais da inflamação².

Estudos sobre teste cutâneo 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. Além disso, a temperatura é um parâmetro pouco estudado, talvez pela dificuldade técnica para realização de estudos precisos. Finalmente, a intensidade do prurido é dependente da subjetividade do paciente. A interpretação dessas características em um único desenvolvimento cinético não foi ainda evidenciada, embora a relação cinética entre elas já seja conhecida na reação tríplice de Lewis.

Objetivo

Demonstrar e comparar a cinética de três sinais inflamatórios da reação cutânea, induzida por puntura, relacionada entre si *in vivo*, pela análise de fotografia digital e termometria cutânea.

Métodos

Estudo experimental, observacional, com coleta de dados da reação cutânea a partir da inoculação de um fármaco e de um antígeno.

Foi aprovado pelo comitê de Ética de pesquisas em seres humanos do hospital onde a pesquisa foi realizada.

Voluntários que durante sete dias antes não tinham feito uso de anti-histamínico ou de outras drogas que pudessem alterar o tamanho da pápula foram selecionados para realização do teste cutâneo: 32 por fotografia digital e outros 15 por termometria cutânea; estes não haviam praticado nenhum tipo de esporte nas quatro horas imediatamente anteriores ao teste.

As características clínicas de cada indivíduo foram determinadas após observação e questionamento pelo pesquisador principal. Consentimento pós-informado de todos os indivíduos ou de seus responsáveis foi obtido previamente ao teste.

Testes e Fotografias

Em todos os testes, uma gota de histamina (10 mg/mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil), uma gota de solução salina e uma gota de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (112.900 UBE mL, IPI-ASAC, São Paulo, Brasil) foram aplicadas na face anterior do antebraço esquerdo dos voluntários, com distância mínima de 3 cm entre elas, introduzidas na epiderme por puntura com agulha 26-G em ângulo de 45° com a superfície da pele.

As fotografias (1040 X 1040 pixels) foram realizadas com câmera digital Olympus 650C, sempre à mesma distância entre a lente e a pele.

Usou-se um círculo como referência de área em local próximo ao teste. Fotografias digitais foram feitas aos 0, 3, 5, 10, 15 e 20 minutos.

Determinação da área da pápula

Para avaliação da pápula por fotografia digital, selecionou-se uma região ao redor do teste. O contorno da pápula foi determinado por filtros de transformação de imagem com auxílio do *software* Adobe Photoshop 6.0®. Estabeleceu-se uma correlação matemática comparando a quantidade de *pixels* da área da pápula com os da área conhecida. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão.

Para avaliação da área do eritema por fotografia digital, recorreu-se à área previamente conhecida colocada perto do 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. Uma área do eritema e todas as áreas similares foram selecionadas com *magic wand tool*, chegando-se ao histograma cuja quantidade de *pixels* foi comparada com a quantidade de *pixels* da área conhecida. Assim obtida a área de cada eritema nos diferentes pontos de análise, seus dados foram colocados no programa Excel, analisados estatisticamente e expressos em média \pm erro padrão.

Determinação da intensidade do eritema

Considerou-se a área da reação induzida pela histamina e pelo extrato de *D. pteronyssinus* (Dp).

O espectro de intensidade do vermelho foi determinado pelo *software* e os resultados foram comparados com uma área adjacente não afetada pela vasodilatação induzida pela histamina e/ou Dp.

Para cada parâmetro determinado, a mediana do histograma foi subtraída dos valores de controle. As diferenças das cores básicas foram corrigidas pela luminosidade e avaliadas em relação ao tempo. A diferença da intensidade da cor para cada tempo de observação foi expressa em média \pm erro padrão.

Determinação da temperatura

Voluntários foram colocados no local do teste vinte minutos antes da sua realização. A filmagem na região do teste foi realizada durante vinte minutos em ambiente controlado, sem corrente de ar, em temperatura ambiente de 19°C, com câmera infravermelha de alta sensibilidade.

A gravação da imagem digital foi feita em 14 *bits* em tempo real. Os dados foram acumulados em *software* específico e a diferença da intensidade de temperatura em cada ponto foi determinada em relação aos valores basais usando o *software* TermaCam® 2000.

Transformação por unidade e determinação da velocidade

Para comparar os achados com diferentes grandezas em relação ao tempo, todos os dados foram transformados por um fator de unidade no 10° minuto de cada grandeza. Dessa forma, a redução ou ampliação se deu na mesma proporção para todos os dados, e cada variável apresentava uma unidade no 10° minuto de avaliação. Os valores foram expressos em unidades \pm erro padrão x tempo (min).

Em cada ponto, determinou-se a velocidade traçando a tangente da curva de intensidade unitária. Cada resultado foi dividido pelo tempo entre cada ponto específico. Os resultados da velocidade foram expressos em unidade \pm erro padrão.

Análise estatística

Para comparar a cinética evolutiva da área para cada estímulo, as análises foram realizadas com ANOVA para medidas repetidas.

Para análise das diferenças entre as velocidades usou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon, uma vez que os dados não apresentavam distribuição normal e resultavam de transformação.

Em todas as análises o valor de $p < 0,05$ foi associado à significância estatística. Os dados foram analisados pelo *software* JMP (SAS Institute, USA).

Resultados

Casuística

Teste cutâneo por puntura foi analisado em 31 voluntários, 58% dos quais do sexo masculino. A média de idade foi de 29,3 anos. Nove voluntários apresentaram positividade ao *D. pteronyssinus*.

Cinética da área do eritema

Não houve diferença significativa da área do eritema entre histamina e Dp ($p = 0,61$). O tamanho máximo do eritema causado pela histamina ocorreu no 10° minuto (440,2 mm²), e pelo Dp no 15° minuto (536,8 mm²) (gráfico 1).

Cinética da área da pápula

Observou-se aumento progressivo na área da pápula induzida tanto pelo Dp quanto pela histamina, com pico máximo no 15° minuto (23,7 mm²) pela histamina e no 20° minuto pelo Dp (26,9 mm²), sem diferença quanto ao desenvolvimento cinético ($p = 0,81$) (gráfico 2).

Gráfico 1 – Cinética do tamanho do eritema por fotografia digital.

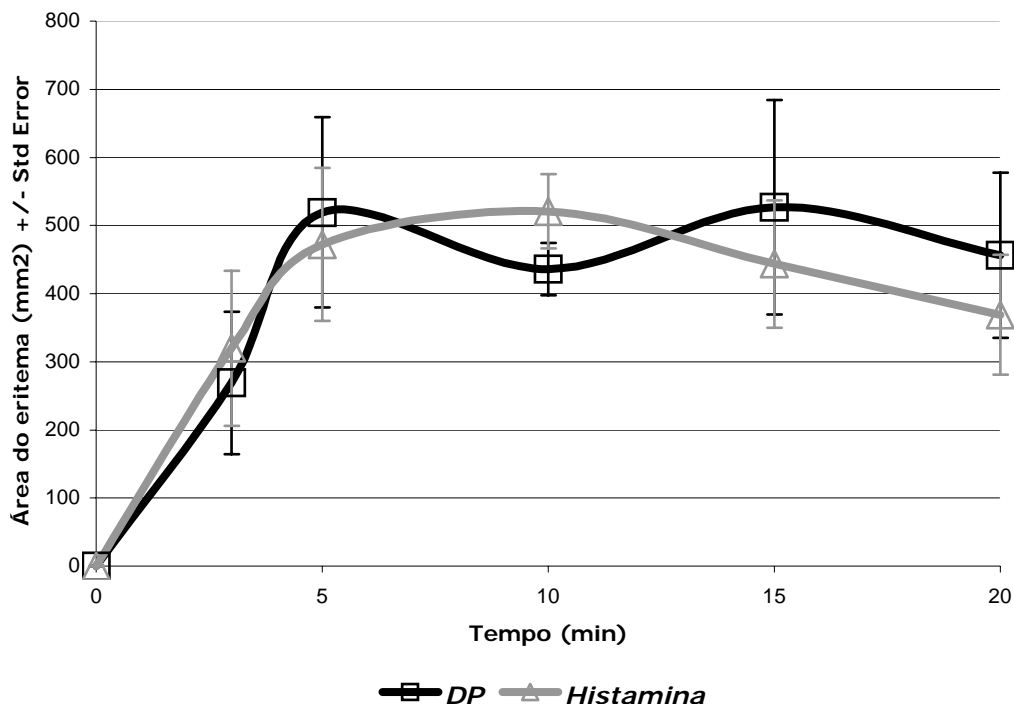
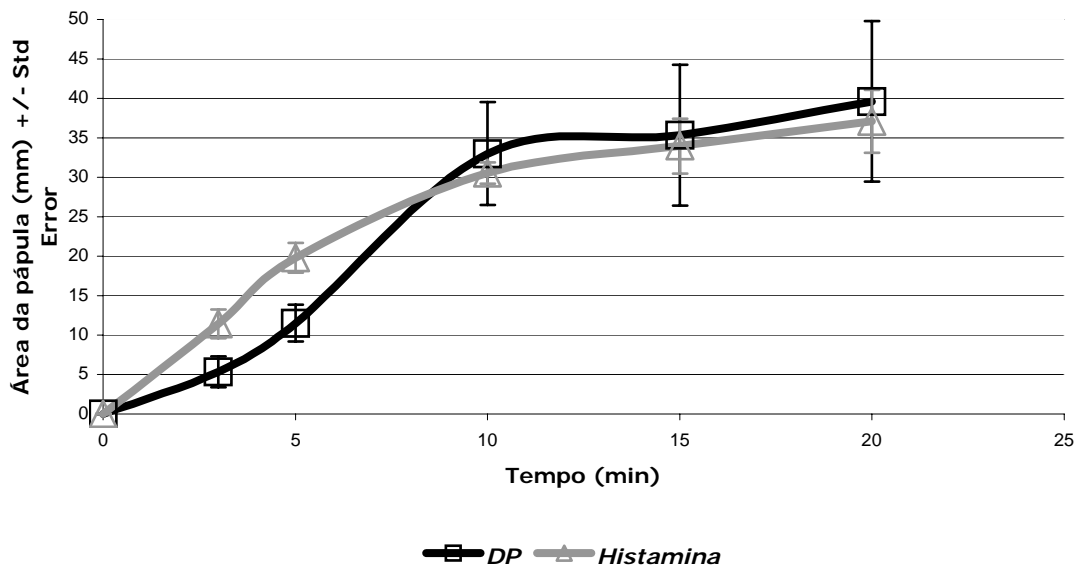


Gráfico 2 – Cinética da pápula pela fotografia digital em mm².



Cinética da intensidade do eritema

Quando comparada à cor da pele normal, a cor vermelha variou significativamente em relação ao tempo de observação, com médias de 0; 4,25±0,96; 5,10±1,04; 3,75±1,80; 7,35±0,6 e 8,05±0,69 nos tempos pré-determinados; a partir do 3º minuto foi estatisticamente maior na área do teste que na área controle (p<0,0001).

A intensidade da cor verde também variou com o tempo, reduzindo-se a partir do 3º minuto após aplicação da histamina (p<0,0001). A intensidade da cor azul não apresentou alteração com o tempo (p=0,67).

Não houve diferença significativa da intensidade do eritema entre histamina e Dp (p=0,6) (gráfico 3 e gráfico 4).

Gráfico 3 – Cinética da intensidade do eritema induzido por histamina.

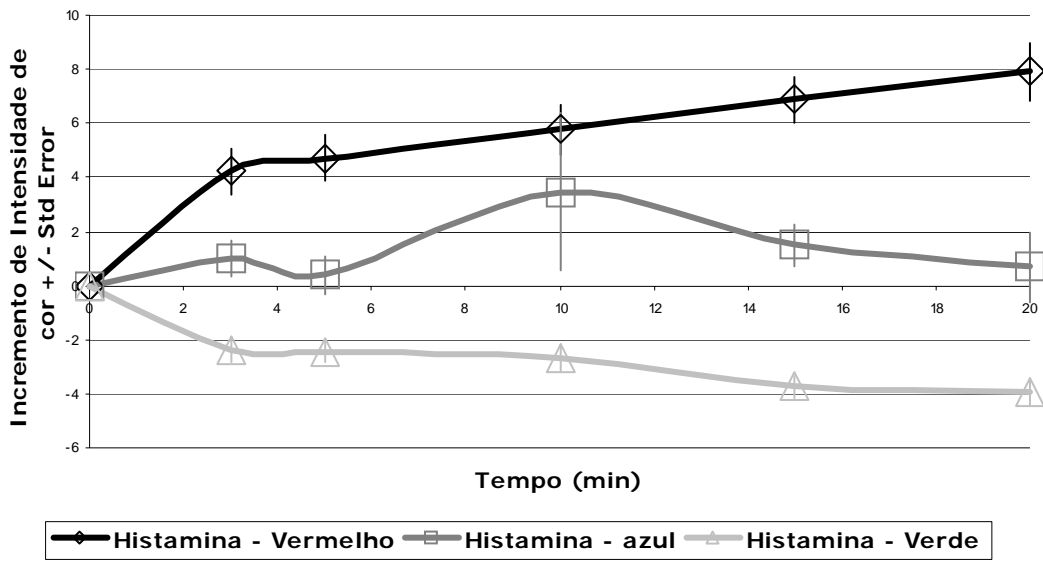
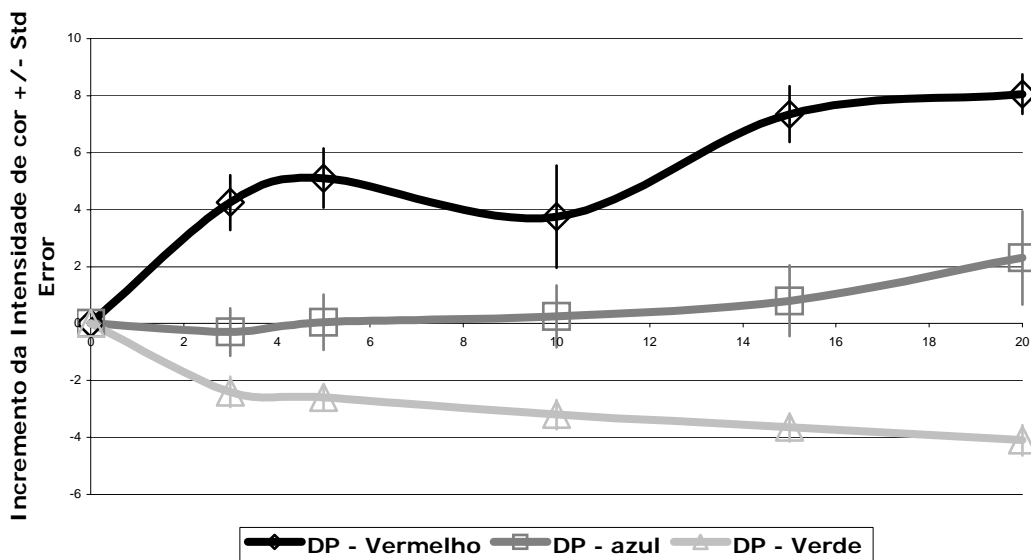


Gráfico 4 - Cinética da intensidade do eritema induzido por extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

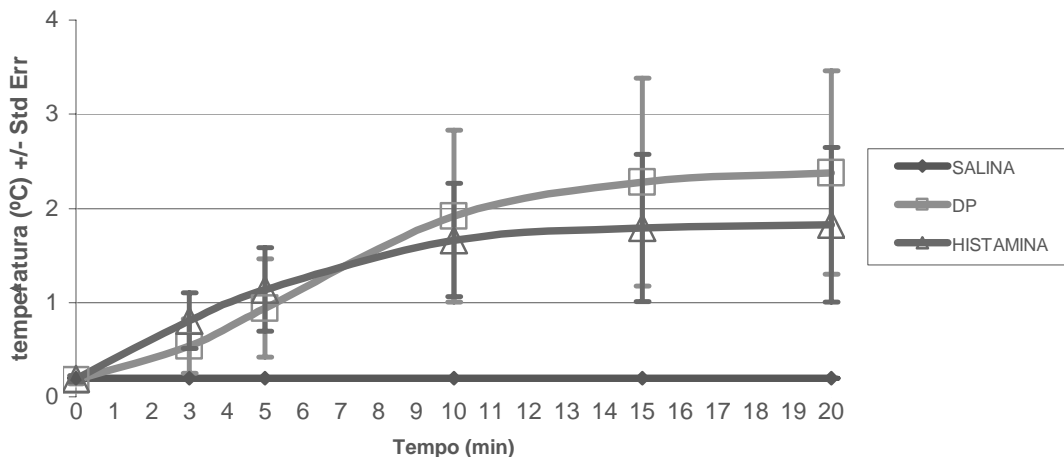


Cinética da temperatura no local do teste cutâneo

A temperatura manteve-se quase constante nos níveis basais nos primeiros dois minutos. Após esse tempo iniciou-se aumento progressivo da intensidade da

temperatura cutânea, com elevação linear de 2°C até o 20º minuto. Não houve diferença significativa da cinética entre os desafios (gráfico 5).

Gráfico 5 - Cinética da temperatura cutânea no local do teste



Cinética da velocidade da reação cutânea induzida por histamina e por aeroalérgeno

Nos primeiros três minutos após a punção, a velocidade da intensidade do eritema foi significativamente maior que a velocidade da pápula e da temperatura ($p=0,05$; $p=0,016$, respectivamente). Já entre o 5º e o 10º minuto a velocidade da pápula foi estatisticamente maior que a do tamanho do eritema ($p=0,05$). Nos últimos cinco minutos houve uma queda significativa da velocidade do tamanho do eritema em relação à sua intensidade.

A cinética das reações cutâneas induzidas pela histamina e pelo *D. pteronyssinus* foi similar, porém com diferença

na velocidade das suas variáveis em determinados tempos de análise.

A velocidade máxima na formação da pápula por histamina foi atingida nos primeiros cinco minutos ($3,80 \pm 0,73$), com maior rapidez da temperatura no 3º minuto, enquanto naquela induzida pelo aeroalérgeno ocorreu entre o 5º e o 10º minuto ($2,42 \pm 0,37$), com velocidade máxima da temperatura no 15º minuto.

A temperatura correlacionou-se significativamente em todos os pontos de análise com o tamanho da pápula (gráfico 6 e gráfico 7).

Gráfico 6 – Cinética dos parâmetros inflamatórios pela fotografia digital e termometria cutânea.

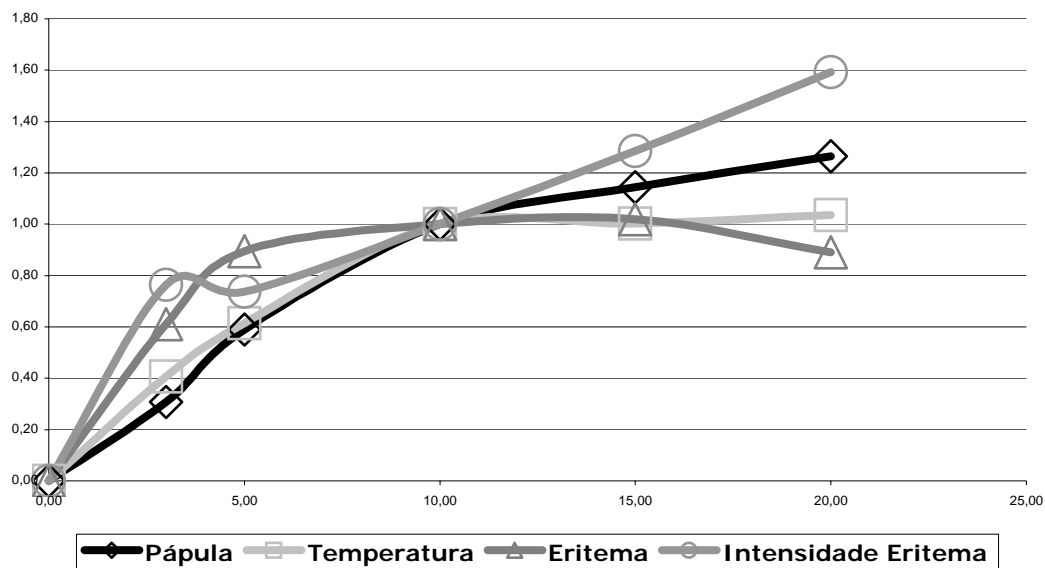
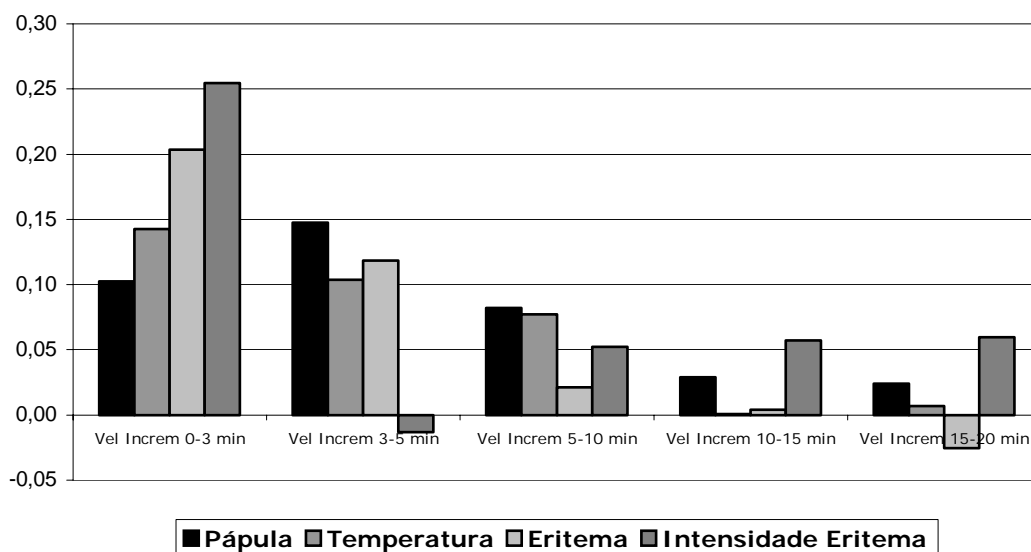


Gráfico 7 – Velocidade dos parâmetros inflamatórios por fotografia digital e termometria cutânea em minutos. Em cada intervalo de tempo as colunas seguem a seguinte ordem: pápula, temperatura, eritema e intensidade do eritema. Vel Incrém 0-3 min = Velocidade de Incremento entre 0 e 3 minutos



Discussão

A combinação de termometria cutânea e de fotografia digital mede a cinética do desenvolvimento da reação cutânea induzida por puntura, independentemente do sexo, do desafio e do fototipo do indivíduo. Esses são meios objetivos que incorporam novas variáveis a serem avaliadas nos testes cutâneos e no diagnóstico das doenças alérgicas mediadas por IgE.

Os resultados do estudo mostram ser possível a avaliação objetiva, dinâmica e fisiológica da reação induzida por puntura, com base em parâmetros como a resposta neural, a vasodilatação e a permeabilidade vascular, os quais podem ser estudados isoladamente sob a influência de anti-histamínicos, antileucotriênicos, bloqueadores de canais de cálcio, entre outros. Também permitem entender variações individuais, tais como a ausência de eritema na presença de pápula e vice-versa.

Estes resultados baseiam-se em conclusões obtidas de maneira independente. Outros dados consagrados na história da reação mediada por IgE confirmam as observações deste estudo.² Este é o primeiro estudo realizado com seres humanos, *in vivo*, usando técnica não invasiva que deriva parâmetros inflamatórios para inclusão de variáveis determinantes da reação cutânea.

A análise dos dados mostra diferenças significativas entre alguns parâmetros ajustados para unidade única, forma essa com que se afastou a possibilidade de que tais diferenças se devessem apenas ao acaso. A presença da reação cutânea à histamina e ao extrato de *D. pteronyssinus*, com ausência de diferença de cinética entre esses indutores, confirmou a inexistência de problemas com a coleta da amostra.

O aumento mais precoce da intensidade e do tamanho do eritema sugere que esses eventos são mediados pelo reflexo neural, que é o mais rápido após o início do desafio. Após esse reflexo, sabe-se que há aumento da permeabilidade vascular, evidenciado pela progressão sequencial do tamanho da pápula. Ao mesmo tempo, como resultante do edema formado, há aumento da temperatura, que atinge um platô do limite da temperatura central.

Os achados aqui relatados são consistentes com os de outros estudos. Bagnato et al. correlacionaram o desenvolvimento da pápula com o aumento da temperatura local por imagem infravermelha³; nesse estudo, entretanto, nada havia sobre o tamanho ou a intensidade do eritema.

Estudo feito com *laser Doppler flowmetry* verificou rápido aumento do fluxo sanguíneo tanto no eritema como na pápula; aumento esse maior no eritema entre 6,5 a 13 minutos após a puntura. O aumento do fluxo no local do aeroalérgeno só foi observado após 2,5 minutos⁴. Embora esses dados apresentem alguma semelhança com os obtidos no presente estudo, não foram caracterizados nessas investigações os aspectos da intensidade e do tamanho da reação.

A fotografia digital como recurso para análise mais objetiva de lesões cutâneas tem sido objeto de vários estudos^{5,6,7}, porém um único foi realizado para avaliação da reação cutânea⁸. Usando nove cães, nos quais a reação foi induzida intradermicamente com histamina, a pesquisa demonstrou que o eritema é mais bem avaliado por fotografia do que a olho nu ou cromometria.

Algumas questões devem ainda ser consideradas neste relato.

O objetivo inicial desta pesquisa — de fazer estudo comparativo da termometria cutânea e da fotografia digital como recursos de análise objetiva da reação cutânea — mostrou-se impossível de realizar, por ser a termometria mais susceptível às interferências do meio.

Outro ponto refere-se à interpretação dos dados, que se baseou em dogmas aceitos na literatura e não confirmados direta ou indiretamente.

Aspecto importante também a ser relevado foi o custo tecnológico. A câmera para captação de imagem infravermelha e o *software* para determinação da temperatura usados neste estudo custam bem mais do que o material similar encontrado no mercado. Entretanto, a máquina fotográfica digital e sua tecnologia apresentam baixo custo relativo e encontram-se popularizadas mesmo em regiões de menor poder aquisitivo do país e no exterior.

Diferente dos estudos encontrados na literatura, este enfatiza o valor da inclusão de variáveis outras na determi-

nação do resultado do teste cutâneo, como a intensidade do eritema, além disso, apresenta técnica que permite melhor documentação da reação e facilita o estudo de novos extratos antigênicos e drogas. Assim, este trabalho pretende demonstrar que é possível avaliar a cinética da reação pela velocidade de desenvolvimento e comparar as variáveis reduzindo-as a uma unidade única.

Independentemente da necessidade de mais estudos para a compreensão destes achados na prática clínica, é importante destacar que eles confirmam e dão acesso, de maneira objetiva, a dados ainda não considerados na avaliação do teste cutâneo.

Estudos com o uso de anti-histamínicos estão sendo iniciados com o intuito de avaliar essas variáveis em indivíduos sintomáticos ou não a um determinado antígeno.

Pelas análises de fotografias digitais e termometria cutânea, obtidas da reação cutânea induzida por punção, foi possível a mensuração da reação triplice de Lewis pela intensidade e cinética de desenvolvimento; além disso, adicionou variáveis que podem ser medidas em conjunto sob outras condições experimentais.

Referências

1. Plytycz B, Seljelid R. From inflammation to sickness: historical perspective. *Arch Immunol Ther Exp* 2003;51:105-9.
2. Serafin WE, Ausren KF. Current concepts: mediation of immediate hypersensitivity reactions. *N Engl J Med* 1987;317:30.
3. Bagnato GF, Gulli S, Denuzzo G, Di Cesare E, Sansotta C, D'Ambrosio FP ET AL. Measurement of allergen-induced skin reactions by computerized dynamic telethermography (CDTT). *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997;7:238-41.
4. Olsson P, Hammarlund A, Pipkorn U. Wheal-and-flare reactions induced by allergen and histamine: evaluation of blood flow with laser Doppler flowmetry. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:291-96.
5. Fleming MG. Digital dermoscopy. *Dermatol Clin* 2001;19:359-67.
6. Cascinelli N, Ferrario M, Bufalino R, Zurrida S, Galimberti V, Mascheroni L et al. Results obtained by using a computerized image analysis system designed as an aid to diagnosis of cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 1992;2:163-70.
7. Jamora MJ, Wainwright BD, Meehan SA, Bystryk JC. Improved identification of potentially dangerous pigmented skin lesions by computerized image analysis. *Arch Dermatol* 2003;139:195-98.
8. Boysen L, Sorensen P, Larsen M, Serup J, Kristensen F. Evaluation of skin erythema by use of chromametry and image analysis of digital photographs after intradermal administration of histamine in dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:565-69.

Agradecimento

Ao engenheiro Mário Cimbalista Jr que gentilmente cedeu os equipamentos, e realizou a filmagem, de termometria em infravermelho.

Correspondência:

Prof. Dr. Hermênio C. Lima
Núcleo de Pesquisas em Imunodermatologia Clínica e Imunologia Clínica
Rua XV de Novembro, 1206 – Centro
80060-950 – Curitiba – PR
E-mail: hclima@ufpr.br
hclima@uol.com.br
rosalyvs@hotmail.com