MARIANA TREMEL BARBATO

Associação de acrocórdones e resistência à insulina: imunomarcação cutânea do peptídeo insulinotrópico dependente de glicose

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbato, Mariana Tremel
Associação de acrocórdones e resistência à insulina : imunomarcação cutânea do peptídeo insulinotrópico dependente de glicose / Mariana Tremel Barbato. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Paulo Ricardo Criado.

Descritores: 1.Resistência à insulina 2.Pele 3.Fibroma 4.Incretinas 5.Peptídeos 6.Glucose 7.Imunoistoquímica 8.Fator de crescimento insulin like-1

USP/FM/DBD-406/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu marido Rodrigo que me apoiou em mais esta etapa, sempre me incentivando com seu amor e companheirismo.

Aos meus pais Ingrid e Jorge Barbato, pela presença constante na minha vida, por me permitirem chegar até aqui e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Jorge, meu grande amigo, que com sua alegria sempre esteve ao meu lado.

Ao meu professor e amigo Dr Paulo Ricardo Criado que acreditou em mim e me proporcionou esta oportunidade única.

A minha professora e amiga Dra. Cláudia Figueiredo que com seu conhecimento e capacidade técnica, tornou viável este trabalho.

A Deus que permitiu que eu chegasse até aqui, superando todos os obstáculos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo Criado, por acreditar no meu trabalho, pela sua dedicação, pelo incentivo constante, por estar sempre ensinando e pelo seu conhecimento admirável.

À Dra. Cláudia Pinto Figueiredo que com seu conhecimento técnico e científico, me acolheu e disponibilizou seu tempo e laboratório para preparar as lâminas e realizar as reações imunohistoquímicas.

À Dra. Gabriela Di Giunta que realizou os exames histopatológicos e esteve sempre disponível no decorrer de todo o estudo.

As alunas de medicina, agora já formadas, Dra. Gabriela Barbaresco e Dra. Renata Pamplona, por ajudarem na seleção dos pacientes e auxiliarem na execução do trabalho, sempre muito solícitas e eficientes.

Ao serviço de patologia do Hospital Universitário da UFSC, a Dra Daniela, aos residentes da patologia, as funcionárias Cátia e Erondina pela disponibilidade.

Aos residentes da dermatologia: Dra Evelyne Averbeck , Dra Ana Kris da Silva, Dra. Marina Guerini, Dra. Naiana Sá, Dr. Márcio Gaio, Dra. Simone Bertoldi, Dr. Leonardo Abi Saab e Dr. Oscar Dimatos, pelo incentivo e ajuda constante.

Aos funcionários do laboratório de farmacologia da UFRJ por abrirem as portas de seus laboratórios e me receberem, sempre, muito bem.

Aos funcionários da pós-graduação de dermatologia da USP por estarem sempre disponíveis para tirar qualquer dúvida.

Ao meu colega e amigo Dr. Luis Torezan por estar sempre disposto a me ajudar, e ser minha referência de doutorando do HC da FMUSP.

Aos pacientes, que acreditaram no trabalho e aceitaram participar deste estudo, permitindo que todo este objetivo se concretizasse.

Aforismos de Sir Willian Osler aplicados a esta tese:

"Os pacientes são o nosso melhor livro-texto"

"É mais importante saber que tipo de pessoa tem essa doença, do que saber que tipo de doença essa pessoa tem"

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de International Commitee of Medical Journals Editours (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e documentação; 2004.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 06
2.1 Obesidade..... 07
2.2 Resistência Insulínica..... 08
2.3 Acrocórdones..... 16
2.4 Outra dermatose associada à resistência insulina: Acantose Nigricante 24
2.5 Fatores de crescimento e incretinas na resistência à insulina..... 30

3. OBJETIVOS..... 38

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 39
4.1 Amostra..... 40
4.2 Preenchimento de questionário..... 41
4.3 Exame clínico..... 41
4.4 Exames bioquímicos..... 44
4.5 Biópsias de pele em dois locais (área acometida e não acometida)..... 43
4.6 Análise Imuno-istoquímica..... 44
4.7 Análise de Imagem..... 46
4.8 Análise estatística..... 51

5. RESULTADOS..... 52
5.1 Resultados dos exames laboratoriais..... 54
5.2 Resultados imuno-histoquímicos 58
6. DISCUSSÃO..... 64
7. CONCLUSÕES..... 74
8. REFERÊNCIAS..... 75
ANEXO 1.....
ANEXO 2.....
ARTIGOS.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos eventos hormonais induzidos pela resistência à insulina, levando a condições de fator de crescimento elevado e desregulado e outras anormalidades..... 12

Figura 2. Cálculo do Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA)..... 13

Figura 3. Demonstração esquemática dos efeitos da hiperinsulinemia nos diversos órgãos e tecidos..... 13

Figura 4. Proposição de ações do IGF-1 no mecanismo fisiopatogênico da acne vulgar..... 14

Figura 5. Acrocórdone típico, como lesão pedunculada da cor da própria pele do indivíduo..... 16

Figura 6. Acrocórdone na axila, lesão séssil da cor da pele..... 17

Figura 7. Histologia do acrocórdone (Hematoxilina-Eosina)..... 18

Figura 8. Mecanismo desencadeador das lesões de acantose nigricante associada à endocrinopatia..... 25

Figura 9. Atuação do Peptídeo Insulinotrópico dependente de Glicose (GIP) nos tecidos..... 36

Figura 10. Programa ImageJ, imagem de pele corada em HE (hematoxilina-eosina) ainda contendo a derme e camada superficial de queratina..... 47

Figura11. Recortes da epiderme para determinar a área total, através da ferramenta de análise de medidas do programa Image J..... 48

Figura 12. Realização do *treshold* com marcação dos tons de marrom..... 49

Figura 13. Cálculo da área imunomarcada na epiderme, após especificados quais os tons de castanho representam a imunomarcação do GIP (ferramenta de análise de medidas do programa Image J).... 50

Figura 14. Gráficos demonstrando a diferença entre os grupos com lesões (AC), grupo controle com média, desvio padrão e valor de p..... 55

Figura 15. Gráfico com valores médios do HOMA para os grupos com lesões (AC) e grupo controle, com DP (desvio padrão) e valor de p..... 57

Figura 16. Pele imunomarcada pelo IGF-1 nos 3 grupos: grupo controle (pele remanescente de cirurgia pástica), pele de lesão e pele aparentemente normal de indivíduo com AC. A pigmentação acastanhada demonstra a imunomarcação com IGF (marcado pela seta) no núcleo dos queratinócitos..... 59

Figura 17. Gráfico da diferença entre as porcentagens (%) de áreas positivas para proteína IGF-1 nas lesões de acrocórdones, pele normal dos indivíduos com AC e nos indivíduos normais..... 60

Figura 18. Comparação da imunomarcação com IGF dos pacientes sem e com resistência à insulina..... 60

Figura 19. Pele imunomarcada pelo GIP nos 3 grupos: grupo controle (pele remanescente de cirurgia pástica), pele de lesão e pele normal de indivíduo com AC..... 61

Figura 20. Gráfico da diferença entre as porcentagens (%) de áreas positivas para marcação do GIP nas lesões de acrocórdones, pele normal dos indivíduos com AC e nos indivíduos normais (grupo controle).....

Figura 21. Gráfico da imunomarcação com GIP dos pacientes sem e com resistência à insulina..... 62

Figura 22. Gráfico da comparação do HOMA para o grupo com lesões (AC) e para a população brasileira, segundo categorias do Índice de Massa Corporal (IMC)..... 68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Descrição da amostra dos pacientes com AN e/ou AC..... 53

Tabela 2. Exames laboratoriais, diferença entre os grupos com lesões cutâneas (AC) e grupo controle (indivíduos sem AC)..... 54

Tabela 3. Exames bioquímicos e HOMA no grupo de pacientes com lesões (AC), estratificado em grupos de indivíduos obesos e não obesos..... 56

Tabela 4. Índice HOMA, média e (DP), teste t (com Graus de Liberdade) e valor de p entre grupo lesão, AN, AC comparados com grupo controle..... 57

Tabela 5. Comparação entre os valores do HOMA para o grupo com lesões (AC) e para a população brasileira, segundo categorias do Índice de Massa Corporal 67

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Acrocórdons
AN	Acantose nigricante
ATPS	3-amino-propil-trietoxisilano
B2ADR	Receptor Adrenérgico B2
B3ADR	Receptor Adrenérgico B3
DM	Diabetes Mellitus
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGF-R	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR-1	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico-1
ERB B1	Receptor de EGF Her-1
ERB B2	Receptor de EGF Her-2
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
FGF-R	Receptor de Fator de Crescimento de Fibroblastos
GGT	Gama Glutamil Ttranspeptidase
GH	Hormônio de Crescimento
GIP	Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose
GIPR	Receptor do Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose
GLP-1	Peptídeo-1 Glucagon *símile*
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	Modelo de Avaliação da Homeostase
HOMA-IR	Modelo Homeostático de Resistência à Insulina
HPV	Papiloma Vírus Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF	Fator de Crescimento Insulina
IGF-1	Fator de Crescimento de Insulina *símile*
IGFBP-1	Proteína Transportadora de IGF-1
IGFBP-3	Proteína Carreadora de IGF do tipo 3
IGF-R	Receptores de Fator de Crescimento de Insulina
IMC	Índice de Massa Corporal

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio Luteinizante
MAPK	Ativador Mitogênico de Proteína Kinase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor-1 do Ativador do Plaminogênio Tecidual
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Proteína C Reativa
Pi3K/Akt	Fosfatidilinositol-3 Kinase
PLC	Fosfolipases
RI	Resistência à Insulina
SDHEA	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
SHBG	Proteína Transportadora do Hormônio Sexual
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
TGF-alfa	Fator de Crescimento Tumoral alfa
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UKPDS	United Kingdon Prospective Diabetes Study
USP	Universidade de São Paulo
17-OHP	17- Hidroxiprogesterona

RESUMO

Barbato MT. Associação de acrocórdones e resistência à insulina: Imunomarcação cutânea do peptídeo insulinotrópico dependente de glicose [Tese}. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Os acrocórdones (AC) são fibromas cutâneos pedunculados, de 2 a 6mm, encontrados, mais frequentemente, nas áreas de dobras de pele. Aventa-se que a insulina ou fatores de crescimento de insulina símile (IGF-1) sejam implicados na etiopatogenia dos AC. Sendo assim, foi sugerida a associação dessas lesões com a resistência à insulina (RI). O peptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP) é uma incretina com ação insulinotrópica e mostrou-se aumentado em pacientes obesos e diabéticos, porém nunca foi demonstrado na pele de pacientes com AC. O estudo da expressão tecidual de fatores de crescimento e incretinas na pele de pacientes com AC, confrontando com parâmetros de RI no sangue periférico, poderão vir a se tornar importantes ferramentas de investigação de em quais cenários clínicos os achados dermatológicos poderiam ou não implicar na necessidade de uma propedêutica laboratorial na detecção da RI. Os objetivos do estudo foram: Identificar a expressão do GIP e IGF-1 nas lesões de AC e na pele sã (sem lesões) dos mesmos pacientes, bem como na pele de pacientes sem acrocórdones (indivíduos controles) por meio de análises imunoistoquímicas, correlacionando esta expressão com o fenômeno de resistência a insulina. Foram estudados 57 pacientes com AC e comparou-se os resultados bioquímicos com grupo controle composto por 16 pacientes sem AC. Realizaram-se as reações imunoistoquímicas para o GIP e IGF-1 na pele de AC, na pele dos pacientes com AC em área não acometida por lesões e na pele controle remanescente de cirurgia plástica. Os resultados mostraram que os exames bioquímicos como glicemia, insulina, triglicerídeos e gama glutil aminotransferase (GGT) estavam aumentados no grupo com AC, bem como o índice HOMA-IR. A imunomarcação pelo IGF-1 não diferiu na pele dos 3 grupos, enquanto a imunomarcação do GIP na pele com AC foi maior que nor outros 2 grupos (controle e normal), com $p<0.05$. Quando o grupo de AC foi dividido em indivíduos com RI e sem RI, não houve diferença estatística na marcação do IGF-1, mas a marcação do GIP na epiderme foi menor nos pacientes que apresentavam RI.

Descritores: Resistência à insulina; pele; fibroma; incretinas; peptídeos; glucose; imunoistoquímica; fator de crescimento insulin like-1

ABSTRACT

Barbato MT. Association between acrochordons and insulin resistance: immunohistochemical cutaneous expression of glucose-dependent insulinotropic peptide [Thesis}. Sao Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Acrochordons (AC) are pedunculated fibromas of the skin, 2 to 6mm found more often in areas of skin folds. It is suspected that insulin or insulin growth factor (IGF-1) are implicated in the pathogenesis of AC. Therefore, it was suggested that these lesions are associated with insulin resistance (IR). The glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) is an incretin with insulinotropic action and was increased in obese and diabetic patients, but has never been demonstrated in the skin of patients with AC. The study of tissue growth factors and incretins in the skin of patients with AC, confronting with IR parameters in peripheral blood, are likely to become important research tools for in wich clinical scenarios the dermatological findings might or might not result in the need of laboratory methods for the detection of IR. The study objectives were: to identify the expression of IGF-1 and GIP in AC lesions and healthy skin (no injuries) from the same patients as well as in the skin of patients without acrochordons (control subjects) by immunohistochemical analysis, correlating this expression with the phenomenon of insulin resistance. We studied 57 patients with AC and compared the biochemical results with the control group consisted of 16 patients without AC. Immunohistochemistry for GIP and IGF-1 was performed in the skin of AC, in the skin of patients with AC in the area not affected by the skin lesions and in control skin group remaining plastic surgery. The results showed that the biochemical tests as blood glucose, insulin, triglycerides and gamma glutil aminotransferase (GGT) were higher in the group with AC, and the HOMA-IR index too. The IGF-1 expression did not differ in the skin of the 3 groups, whereas GIP expression of skin with normal AC was higher than the other 2 groups (control and normal), with $p < 0.05$. When the AC group was divided into individuals with and without IR, there was no difference in IGF-1 marking, but the marking on the skin of GIP was lower in patients with IR.

Descriptors: Insulin resistance; skin; fibroma; incretins; peptides; glucose; immunohistochemistry; insulin like growth factor-1

1. INTRODUÇÃO

Os acrocórdones (AC) são lesões pedunculadas de 2-6 mm, da cor da pele ou acastanhadas, mais frequentemente, encontrados no pescoço, axilas, virilhas e pálpebras[1, 2]. Os AC são causados por fatores de estímulo epidérmico nos queratinócitos e proliferação de fibroblastos na derme. Aventa-se que a insulina ou fatores de crescimento relacionados à insulina sejam implicados na etiopatogenia[2]. As endocrinopatias estão entre as principais causas destas dermatoses, principalmente a obesidade[3].

Touraine e colaboradores[4] propuseram a possibilidade da associação de acrocórdones com diabetes mellitus (DM) em 1951.

Vários estudos têm demonstrado relação de acantose nigricante (AN) e AC com resistência à insulina. Em um estudo recente[5] com crianças mexicanas, buscou-se avaliar a correlação entre a presença de AC e AN nas crianças com resistência à insulina de acordo com o cálculo do HOMA-IR (Modelo Homeostático de Resistência à Insulina) e estabelecer a relação com sobrepeso e obesidade. Os pesquisadores encontraram relação de AC e AN com alto índice de massa corporal (IMC) e resistência à insulina (RI).

A redução da ação insulínica pode estar acompanhada de um grupo de alterações metabólicas como hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, redução do HDL/colesterol, intolerância aos carboidratos, obesidade centrípeta, aumento do inibidor-1 do ativador do plasminogênio tecidual (PAI-1), hiperuricemia e doença cardiovascular aterosclerótica, sendo este conjunto de alterações conhecido como *síndrome de resistência à insulina* ou *síndrome metabólica* [6, 7].

A resistência à insulina (RI) representa juntamente com o tabagismo, o alcoolismo e a violência no transito, um dos fatores modificáveis mais importantes para a promoção da saúde e a redução geral da mortalidade populacional[8].

Dwivedi e Jhamb[9] estudaram os marcadores cutâneos em doença coronária, e verificaram que os acrocórdones, a acantose nigricante, o xantelasma e o xantoma podem auxiliar a identificar os pacientes assintomáticos, mas com alto risco de desenvolver doença coronariana aguda.

A insulina é considerada um hormônio promotor de crescimento. A hiperinsulinemia aumenta a concentração sérica de fator de crescimento insulina *símile*-1 (IGF-1) livre, e simultaneamente reduz a proteína carreadora de IGF do tipo 3 (IGFBP-3). Quando o IGF-1 atua nos receptores dos queratinócitos, promove hiperplasia epidérmica. Por outro lado, a diminuição de IGFBP-3, o qual é um ligante do receptor de retinóide no núcleo, diminui a transcrição de agentes anti-proliferativos que são normalmente ativados pelos retinóides endógenos. Assim, o aumento de IGF-1 e a diminuição de IGFBP-3 alteram a proliferação e o crescimento celular, manifestando papilomas cutâneos (acrocórdones) e acantose nigricante[10]. Os AC são também resultado da proliferação dos fibroblastos via ativação de receptores de IGF-1 nas áreas de dobras[1].

De acordo com Jowkar e colaboradores[11], os níveis de insulina em pacientes com acrocórdones são maiores que em indivíduos sadios, sugerindo a importância da insulina na patogênese desses. Porém ainda não se conseguiu demonstrar uma correlação com os níveis de IGF-1[11].

Os marcadores imuno-histoquimicos EGF (fator de crescimento epidérmico) e IGF já foram identificados nas lesões cutâneas com proliferação exagerada da epiderme[12, 13].

Nanney e colaboradores[12] observaram que o crescimento das lesões de acrocórdones se correlaciona com o aumento do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R) na epiderme. Marthur e Bhargava[13] propuseram que o aumento da expressão do EGF-R deve ser causado pelo aumento de lipídios séricos encontrados na condição de hiperinsulinemia[13].

Os hormônios chamados incretínicos (ou incretinas) são hormônios gastrointestinais; seu “efeito incretina” ocorre quando a glicose é administrada oralmente e a insulina começa a ser produzida pelas células beta pancreáticas para não permitir um aumento da glicemia[14].

As duas mais importantes incretinas são Polipeptídeo Insulinotrófico dependente de Glicose (GIP) e Peptídeo - 1 Glucagon *símile* (GLP-1)[14].

GLP-1 e GIP são pequenos peptídeos, com 30 e 42 aminoácidos, respectivamente. Ambos são liberados pelas células enteroendócrinas. Estes peptídeos estimulam a liberação de insulina apenas quando a glicose sangüínea está elevada, aumentando a capacidade secretória do pâncreas endócrino na hiperglicemia pós-prandial[15].

O peptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP) é encontrado em pacientes diabéticos e obesos, e até o presente momento não foi demonstrado na pele normal[16] ou acometida por acrocórdones, de acordo com as bases de dados pesquisadas (PubMed-Medline, Lilacs e Cochrane) até outubro de 2012.

Facilmente identificável, os AC tornam-se um sinal para rastreamento de resistência à insulina e do diabetes melittus (DM) não insulino-dependente, com consequentes modificações no estilo de vida e tratamento precoce destas endocrinopatias[16,17].

Portanto, os AC não devem ser desconsiderados, já que trazem informações de doenças internas e podem, assim, orientar condutas diagnósticas e terapêuticas prevenindo uma série de morbidades futuras como o DM e doenças ateroscleróticas.

Embora muitas vezes não valorizadas pelos pacientes, já que se tratam de lesões assintomáticas, estes fibromas cutâneos são de grande importância e essa manifestação não pode passar despercebida ao exame clinico dermatológico, já que pode servir como indicador da necessidade de se aferir dados laboratoriais que possam conduzir ao diagnóstico de resistência à insulina.

Assim, o estudo da expressão tecidual de fatores de crescimento e incretinas na pele dos portadores de AC, confrontando com os parâmetros de resistência à insulina no sangue periférico, poderão vir a se tornar importantes ferramentas na investigação de em quais cenários clínicos os achados dermatológicos poderiam ou não implicar na necessidade de uma propedêutica laboratorial na detecção da resistência à insulina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade

A obesidade é definida como um estado patológico do excesso de tecido adiposo para a dimensão corporal. O índice de massa corporal (IMC) é a medida estatística utilizada para classificar sobrepeso e obesidade na população estudada. A Organização Mundial da Saúde (OMS)[18] define sobrepeso como IMC e 25 kg/m^2, e obesidade como IMC e 30 kg/m^2.

Em 2005 a OMS estimou que aproximadamente 1,6 bilhões da população mundial, com idade e 15 anos estavam com sobrepeso. Mais de 400 milhões de adultos (aproximadamente 7%) sofrem de obesidade e, pelo menos, 20 milhões de crianças com menos de 5 anos já tinham sobrepeso[18].

A obesidade é conhecida no mundo todo como um dos maiores problemas de saúde da atualidade[19]. No Brasil, a prevalência de sobrepeso é 43,3% e de obesidade é de 13%[20]. Nos Estados Unidos a porcentagem de pacientes obesos e com sobrepeso chega a 68%[21]. A obesidade não é associada apenas a comorbidades, mas também se associa a um aumento de 20% de mortalidade[22].

A obesidade afeta a fisiologia da pele alterando a função da barreira cutânea, produção de sebo, função das glândulas sudoríparas, vasos linfáticos, estrutura de colágeno, cicatrização, gordura subcutânea, micro e macro circulação[19].

Al-Mutairi[23] realizou um estudo com 437 obesos e detectou que as doenças dermatológicas mais comuns nesses pacientes foram queratose palmo-plantar, acantose nigricante, acrocórdones, estrias, intertrigo e acne.

Boza e colaboradores[3] realizaram um estudo com 76 pacientes obesos e 73 pacientes com IMC normal, para detectar as dermatoses mais frequentes em

pacientes obesos. No estudo, as dermatoses foram controladas para diabetes, dislipidemia e síndrome metabólica. As manifestações cutâneas mais frequentes nos pacientes com IMC e 30 kg/m^2 foram estrias, queratose palmo-plantar, acrocórdones, intertrigo e pseudoacantose nigricante. Os resultados demonstraram que a presença de acrocórdones se associou a obesidade mesmo quando controlada para diabetes, dislipidemia e síndrome metabólica. A obesidade, da mesma forma, foi um fator independente no aparecimento de pseudoacantose nigricante[3].

A associação entre IMC elevado, resistência à insulina e hipertrigliceridemia foi reportada em alguns estudos[11, 8].

A importância do sobrepeso e obesidade vai além do transtorno corporal, já que podem desencadear uma série de complicações graves como DM, dislipidemia, hipertensão arterial, síndrome metabólica, disfunção hepática, dislipidemia, hiperuricemia, entre outros[24, 25, 26].

2.2 Resistência Insulínica

Resistência insulínica (RI) é uma alteração metabólica caracterizada por falhas das células-alvo em responder aos níveis normais de insulina circulantes, o que resulta em hiperinsulinemia compensatória, na tentativa de se obter uma resposta fisiológica adequada[27]. A RI é encontrada, principalmente, em indivíduos com DM tipo 2, DM tipo 1 descompensado, cetoacidose diabética e obesidade[6, 7, 28, 29]. Em populações normais, a RI ocorre em 20 a 25% dos indivíduos[6, 7].

Existem três tipos de RI, que incluem: (i) Tipo A, que ocorre pela diminuição do número e disfunção dos receptores de insulina; (ii) Tipo B, causada pela formação de anticorpos contra os receptores de insulina e o (iii) Tipo C, que corresponde a um defeito pós-receptor. Pacientes obesos e com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) possuem resistência à insulina do tipo A[30].

O DM ocorre quando a capacidade de secreção de insulina falha na redução da glicose sérica. As concentrações de insulina são geralmente elevadas na fase inicial do DM tipo 2, mas os níveis não são suficientes para compensar a resistência à insulina devido ao defeito na célula beta pancreática[30].

Nos últimos 5 anos, evidências sugerem que as doenças associadas com hiperinsulinemia vão muito além de achados como obesidade, aumento de circunferência abdominal, DM tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia e doença coronariana aguda. Condições como acne, menarca em idade mais precoce, alguns carcinomas de células epiteliais (mama, cólon e próstata), estatura aumentada, miopia, fibromas moles (acrocórdones), acantose nigricante, síndrome dos ovários policísticos (SOP) e calvície masculina, podem estar ligadas a hiperinsulinemia[31].

A resistência à insulina aumenta na puberdade e parece ter relação com o acúmulo de gordura[32].

Apesar dos músculos esqueléticos serem os locais principais de captação de glicose estimulada por insulina nos tecidos periféricos, o tecido adiposo, o fígado e as células endoteliais também dependem da insulina para a absorção de glicose[33].

O receptor de insulina pertence à família de receptores tirosina-quinase, que inclui o fator de crescimento insulina-*símile* (IGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), o fator de

crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento estimulante da colônia-I, e os vários receptores de citocinas[34, 35]. A elevada concentração de insulina resulta em uma ativação direta e indireta de receptores de IGF-1 nos queratinócitos e fibroblastos, levando a proliferação destes. Outros mediadores podem contribuir, incluindo outros receptores tirosina-quinase como o receptor de fator de crescimento epitelial (EGF-R) e receptor de fator de crescimento de fibroblastos (FGF-R)[36].

A hiperinsulinemia compensatória suprime a síntese hepática de IGFBP-1, que aumenta a concentração de IGF-1 livre. Com isso, temos uma diminuição do hormônio de crescimento (GH), resultando em redução da IGFBP-3[37].

O IGF-1 é um potente mitogênico, estimulando a proliferação celular de praticamente todos os tecidos do corpo. A diminuição da IGFBP-3 também contribui para a proliferação celular desregulada, já que na sua função normal, esta proteína atua em receptores de retinóides limitando a multiplicação celular em uma variedade de tecidos[38].

A hiperinsulinemia aumenta a produção de andrógenos nos ovários e dos IGF-1 e -2 no fígado. A insulina e o IGF-1 aumentam a atividade da 17-hidroxilase nos ovários, acentuando a produção androgênica, principalmente de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) (Figura 1). Indiretamente, a insulina potencializa a ação do hormônio luteinizante nos ovários[39, 40]. Outro efeito do aumento da insulina é diminuir a produção hepática de proteína transportadora do hormônio sexual (SHBG) e da proteína transportadora de IGF-1 (IGFBP-1) ou proteína ligante de IGF-1, contribuindo para maior ação da testosterona livre e IGF-1, respectivamente nas células-alvo. Estudos *in vitro* mostraram que a insulina e IGF-1 podem também

estimular o crescimento do folículo capilar e atuar em conjunto com andrógenos neste papel. A hiperinsulinemia pode também aumentar a ação da 5-alfa redutase, levando a um aumento da conversão da testosterona em dihidrotestosterona[41] (Figura 3).

A elevação do IGF-1 promove a hiperqueratinização (proliferação de queratinócitos), podendo, inclusive, provocar acne[42] (Figura 4). O IGF-1 fisiológico e fatores relacionados à resistência periférica à insulina (DM, Acromegalia, SOP e variações do gene do IGF-1), o GH e alimentos com alto índice glicêmico promovem um acentuado estímulo do IGF-1 nos queratinócitos da unidade pilossebácea desencadeando sinais intracelulares via MAPK que levam à hiperproliferação epidérmica com aumento da coesão dos queratinócitos no infundíbulo folicular originando microcomedos. O IGF-1 via Pi3k/Akt intracelular nos queratinóscitos estimula a lipidogênese e assim o aumento da secreção de sebo e via PLC ativas as vias inflamatórias, atuando assim em todos os estágios da acne vulgar [42] (Figura 4).

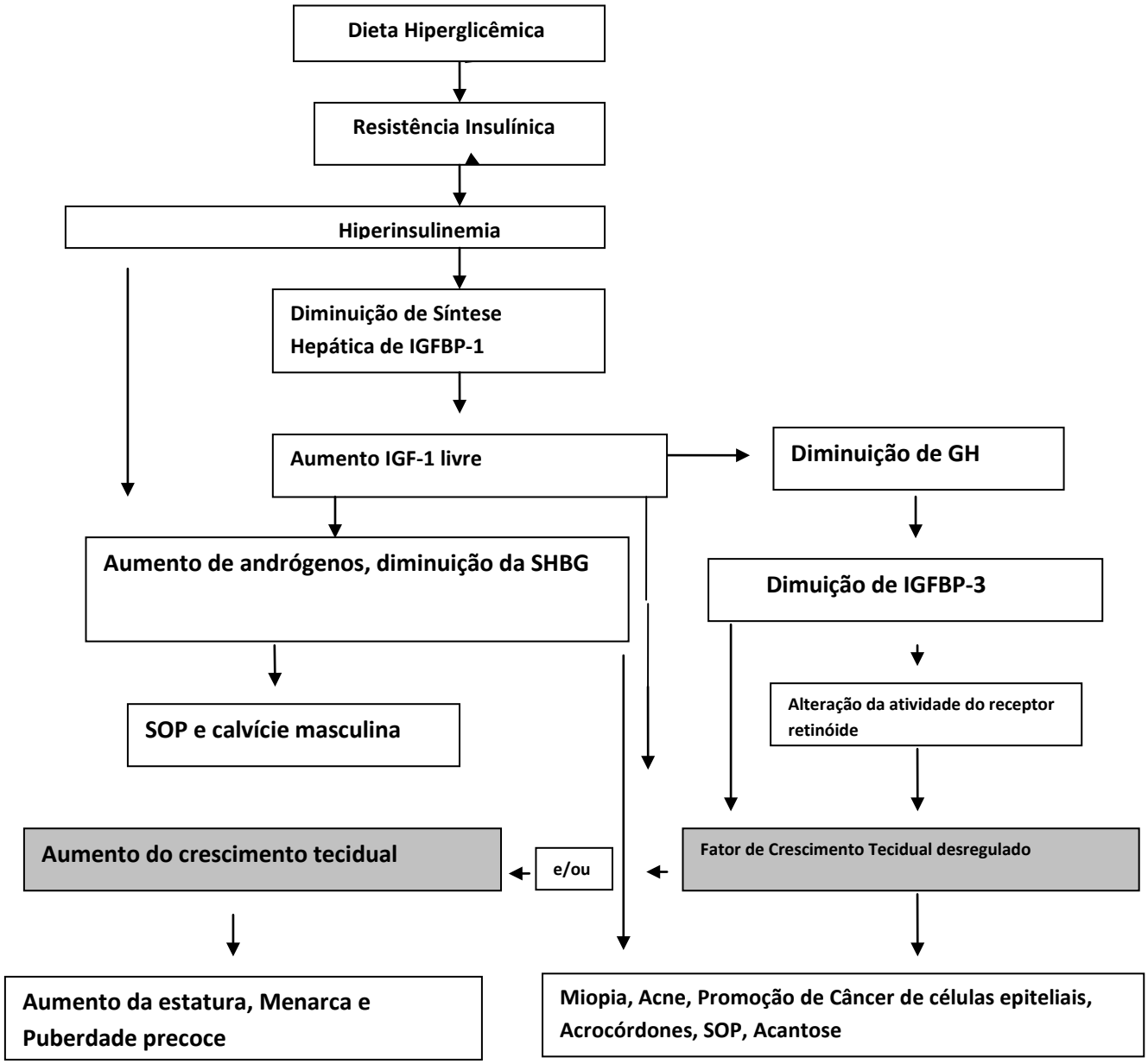


Figura 1. Representação esquemática dos eventos hormonais induzidos pela resistência à insulina, levando a condições de fator de crescimento elevado e desregulado e outras anormalidades. (adaptado de Cordain[31])

$$\text{HOMA} = \frac{\left(\frac{\text{Glicemia em mg/dL}}{18}\right) \times \text{Insulina em uU/mL}}{22{,}5}$$

Figura 2. Cálculo do Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA). No Brasil a maioria dos laboratórios de análises clínicas fornecem o resultado da glicemia de jejum em mg/dl, de forma que para sua conversão em mMol, se faz necessária sua divisão pelo número constante 18.

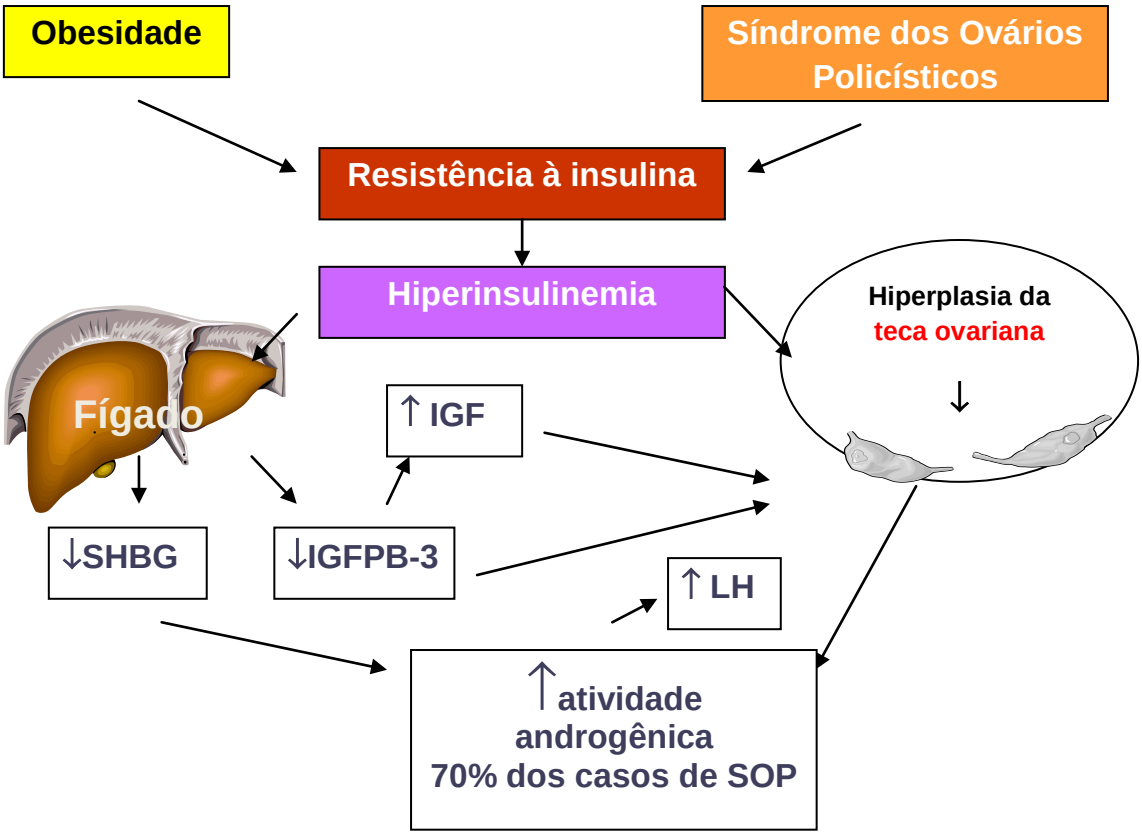
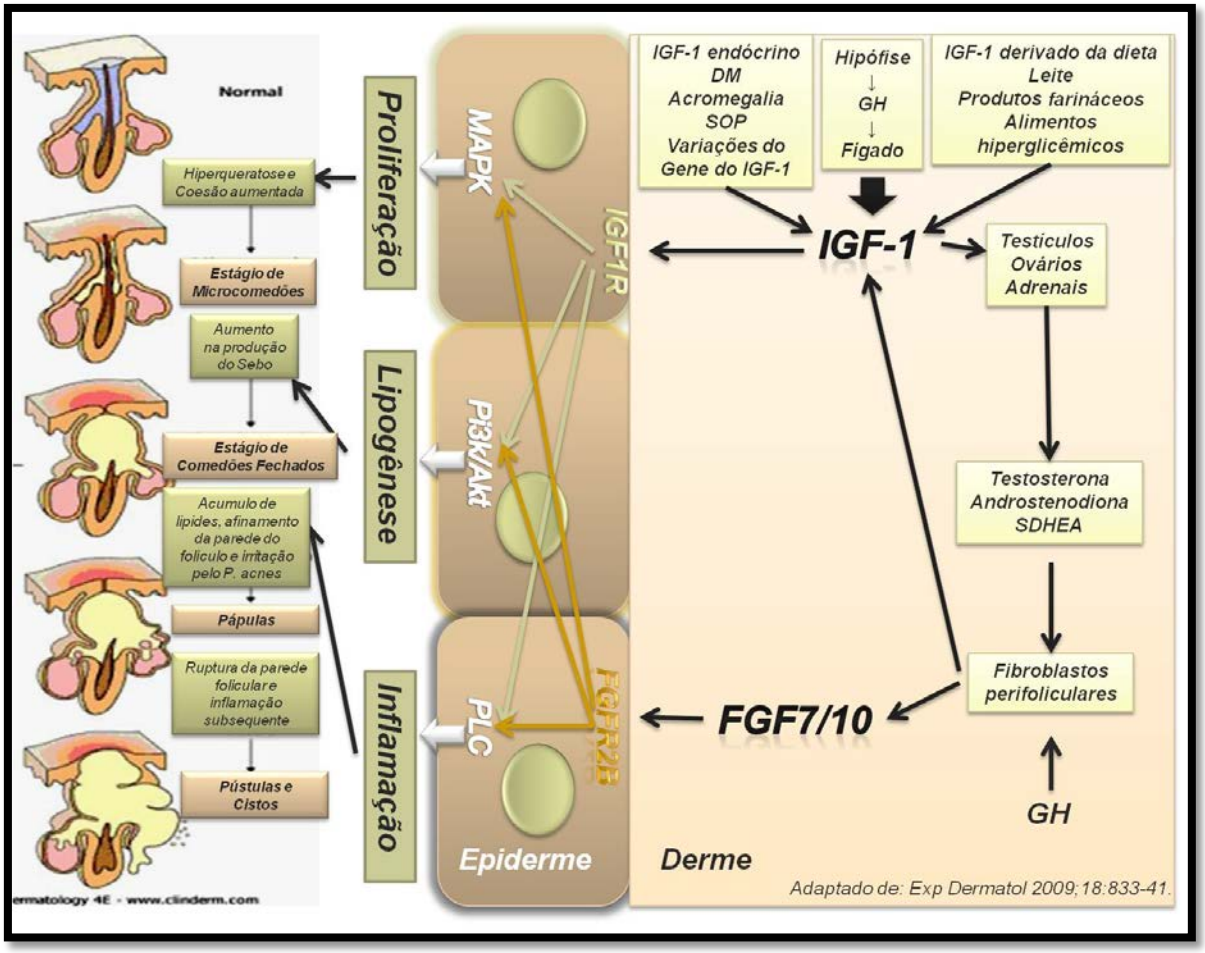


Figura 3. Demonstração esquemática dos efeitos da hiperinsulinemia nos diversos órgãos e tecidos. Autoria: Criado PR & Barbato MT.



IGF-1: fator de crescimento insulina-s*símile* tipo 1; DM: diabetes mellitus; SOP: síndrome dos ovários policísticos; GH: hormônio do crescimento; SDHEA: sulfato de dehidroepiandrosterona; FGF7/10: fator de crescimento de fibroblastos 7/10; MAPK: Ativador Mitogênico de Proteína Kinase ; Pi3k/Akt: Fosfatidilinositol-3 Kinase ; PLC: Fosfolipases. Autoria: Criado PR & Barbato MT

Figura 4. Proposição de ações do IGF-1 no mecanismo fisiopatogênico da acne vulgar.

.

Em ratos, a expressão aumentada de IGF-1 resulta em hiperqueratose epidérmica[43]. Portanto, uma dieta hiperglicêmica somada com a susceptibilidade genética individual, pode desencadear uma cascata de alterações hormonais e de fatores de crescimento, resultando em crescimento rápido dos tecidos, principalmente de tecidos com alta taxa de mitose[1, 5, 8, 9, 31].

Vários são os métodos de avaliação e diagnóstico da RI[1, 5, 8, 9]. A insulinemia de jejum por ser uma medida de fácil utilização em grandes populações, tem sido usada para avaliar a RI. O Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA) é um modelo matemático que prediz a RI pelas simples medidas da glicemia e da insulina no jejum e tem boa correlação com o método do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado padrão-ouro na medida da RI[27, 44]. Seu cálculo, na RI é feito pela multiplicação do valor da glicemia (em mMol) pelo valor da insulinemia (em uU/mL) e divisão deste resultado pela constante 22,5 (HOMA-IR = Glicemia (mMol) x Insulina (uU/mL) ÷ 22,5)[1, 5, 8, 9] (Figura 2). Em estudo realizado com 1898 brasileiros com glicemia de jejum menor que 99mg/dl, Ghringhello e colaboradores propuseram o ponto de corte para o HOMA-IR baseado no IMC, os valores sugeridos para o HOMA-IR foram 1,2 para IMC abaixo de 25kg/m^2, 1,8 para IMC de 25 a 30kg/m^2 e de 2,9 para IMC maior que 30kg/m^2 [45]. Em mulheres considera-se resistência à insulina quando excede o percentil 75 (1.80)[27,46]. Considera-se o diagnóstico de RI quando o valor for maior que 2,71[27], em alguns estudos considera-se RI um valor de HOMA-IR maior que 2,5 [47]. Métodos diretos de avaliação da RI incluem o teste de tolerância à insulina (KITT), o teste de supressão de insulina e as técnicas de clamp hiperglicêmico e euglicêmico. Os custos envolvidos na sua realização, entretanto, limitam o seu uso[27].

2.3 Acrocórdones

Acrocórdones (AC) são tumores comuns da meia idade e dos idosos, que ocorrem principalmente no pescoço, axilas e virilhas; apresentam-se como pequenas protusões amolecidas e pedunculadas[11, 13, 48] (Figuras 5 e 6). As lesões podem ser acastanhadas ou cor da pele e variam de 1 mm até 1 cm em diâmetro[49].

Figura 5. Acrocórdone típico, como lesão pedunculada da cor da própria pele do indivíduo.

Os AC estão frequentemente associados a pequenas queratoses seborreicas[11].

Figura 6. Acrocórdon na axila, lesão séssil da cor da pele.

Os acrocórdones, ou pólipos fibroepiteliais consistem em lesões polipoides, revestidas por epiderme normal ou hiperplásica, envolvendo eixo fibrovascular contendo colágeno frouxo ou denso. A histologia, mais comumente, encontrada é a presença de tecido conjuntivo frouxo recoberto por hiperplasia epidérmica.[50] (Figura 7).

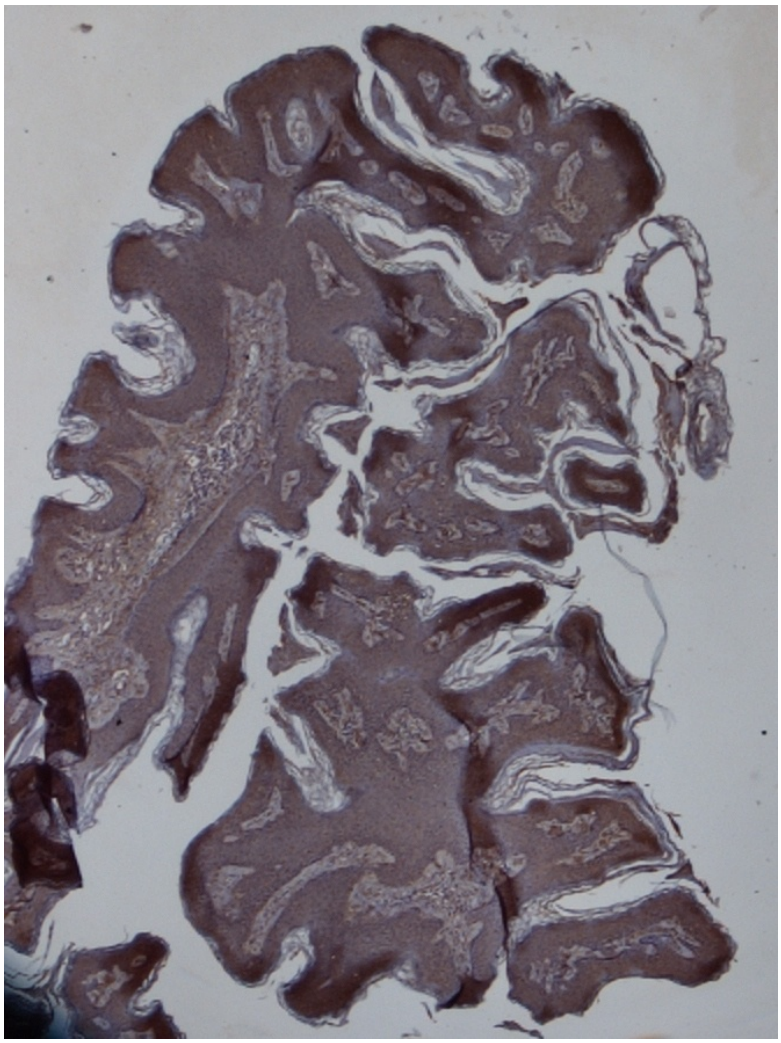


Figura 7. Histopatologia do acrocórdone

Após os 40 anos a freqüência de AC é de 37%, sendo maior que na população geral onde a freqüência é de 20 a 25%[51]. Já Banik[52] coloca que apesar de 46% da população geral possuir AC, apenas 14,4% possuem oito ou mais lesões no corpo. A prevalência de AC na população varia de acordo com a população estudada: 46% em Alemães e 0,7% na India[11]. Em 2006, de acordo com a região do país, estimou-se que de 0,9% a 1,2% dos diagnósticos em consultas dermatológicas no Brasil se referiam aos AC[53]. Homens e mulheres apresentam a mesma incidência

de AC[54, 55]. Jowkar e colaboradores[11] encontraram uma maior prevalência de AC em mulheres, e o local mais comum das lesões foi o pescoço.

Múltiplos AC são frequentemente encontrados em indivíduos obesos e DM não insulino-dependentes; a resistência à insulina é uma anormalidade subjacente às duas condições. A proliferação dos fibroblastos que ocorre nos AC parece ser devida à hiperinsulinemia, via ativação dos receptores de fator de crescimento insulina-símile (IGF-1) presentes em suas superfícies. Os AC estão intimamente relacionados aos níveis de insulina de jejum[13].

Nos últimos anos, alguns estudos tentaram demonstrar a correlação dos AC com a RI, níveis séricos de insulina e os níveis de IGF-1. De acordo com Jowkar e colaboradores[11], os níveis de insulina em pacientes com AC são bem maiores que em indivíduos controle, sugerindo a importância da insulina na patogênese destes. Porém ainda não se conseguiu demonstrar uma correlação com os níveis de IGF-1[11]. De forma similar à acantose nigricante, a insulina não parece ser o único mediador da formação dos AC, mas com certeza é o mais importante na formação dessas lesões cutâneas[1].

Em indivíduos que apresentem múltiplos AC deve ser sempre levantada a suspeita de um distúrbio no metabolismo dos carboidratos, seja ele na forma de RI ou DM[11, 48].

Rasi e colaboradores[10] demonstraram que pacientes com mais de trinta AC aumentam o risco de ter DM em 52%. Nesse estudo o IMC não se relacionou com o número de AC.

Não foi encontrada correlação da topografia dos AC com alteração metabolismo dos carboidratos, exceto nos AC da região infra-mamária nas mulheres[1].

Norris e colaboradores[56] sugeriram um aumento dos níveis circulantes de insulina com o surgimento de AC. Sudy e colaboradores[1] sugeriram que o aumento de insulina circulante atuaria no receptor de IGF-1 que age nas áreas de dobras (virilha, axilha, pescoço), ocorrendo profileração da epiderme.

Segundo Sudy[1], múltiplos AC são mais sensíveis que a acantose nigricante para detectar alteração no metabolismo de glicose e insulina, porém são menos específicos. Portanto, a presença de AC constitui uma pista na detecção de hiperinsulinemia, que é considerada a base para a Síndrome X (síndrome metabólica)[1].

Tamega e colaboradores[8] identificaram associação independente entre a presença de mais de cinco AC e a elevação de 1,4 unidades do índice HOMA-IR, entre pacientes oriundo de atendimentos dermatológicos. A significância da associação com IMC e hipertrigliceridemia encontrada neste estudo fortalece o conceito de que os acrocórdones possam se constituir como marcadores de resistência insulínica[8].

Senel e colaboradores[2] encontraram 56 diabéticos (50.9%) nos 110 pacientes com AC, além disso, detectaram aumento nas enzimas hepáticas, aumento nos lipídeos séricos, aumento no colesterol (colesterol total, LDL e triglicerídeo) e diminuição no HDL, nos pacientes com essas lesões cutâneas. Pacientes com AC também apresentaram maiores índices pressóricos. Neste estudo

não encontraram correlação do número total de acrocórdones e do local das lesões cutâneas com presença ou não de DM[2].

Crook[57] relatou quatro casos de pacientes com múltiplos AC e todos os pacientes apresentaram aumento dos triglicerídeos séricos e redução do HDL colesterol.

Erdogan e colaboradores, o IMC, o HOMA-IR e colesterol total foram significativamente maiores em pacientes com AC quando compardos aos controles. Portanto, concluíram que as lesões de pele podem não ser inocentes proliferações tumorais, mas marcadores de desenvolvimento de doenças sistêmicas associadas a aterosclerose[58].

Sari e colaboradores[59] avaliaram a freqüência de hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina e obesidade em pacientes com AC e os compararam com individuos sem lesões de pele. Os dois grupos foram comparados em relação ao IMC, perfil lipídico, pressão arterial, resistência à insulina, lipídios, insulina, glicose, leptina, de alta sensibilidade à proteína C-reativa, ácidos graxos livres e avaliação do modelo homeostático de resistência à insulina (HOMA-IR). Um total de 53,9 e 33,6% dos pacientes com AC estavam respectivamente com parâmetros para sobrepeso e obesos. A frequência de hipertensão foi de 30,1%, dislipidemia 59,3% e resistência à insulina 21,2% no grupo com AC. Sobrepeso e/ou obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina e elevação de alta sensibilidade a PCR são vistos, mais frequentemente, em pacientes AC. A presença de AC pode ser um marcador de risco aumentado de aterosclerose e doença cardiovascular[59].

Jowkar e colaboradores[11] em 2009, selecionaram pacientes com mais de 3 AC, não diabéticos, e avaliaram a insulina e o IGF-1 em teste de radioimunoensaio, comparando com um grupo controle. A insulina sérica foi significantemente maior nos pacientes com acrocórdones (p=0.00), mas o nível de IGF-1 não apresentou diferença estatística quando comparado aos pacientes sem AC (p=0.43). Este estudo, também demonstra a importância do efeito da insulina na patogênese dos AC[11].

Shaheen e colaboradores[60] selecionaram 90 pacientes com múltiplos acrocórdones e subdividiram em 3 grupos de acordo com IMC (normais, sobrepeso e obesos), quando comparado com os controles, os três grupos de pacientes com acrocórdones apresentaram HOMA-IR significativamente elevados, a leptina sérica estava aumentada apenas nos pacientes obesos e não foi associada à presença de acrocórdones. O cálculo do HOMA-IR é recomendado nos pacientes com AC para detecção precoce de resistência à insulina[60].

El Safoury[61] em 2010 observou o aumento da leptina no tecido de lesões de acrocórdones quando comparada com a pale normal. A leptina é um hormônio envolvido na regulação do apetite, mas não está presente apenas no cérebro, pode estar presente em tecidos periféricos incluindo a pele.

Associa-se a presença de acrocórdones com a gravidez, acromegalia, aos pólipos intestinais[45], dislipidemia e a várias síndromes: ovários policisticos, Birt-Hogg-Dube e Cowden. Variações hormonais estrogênicas estão implicadas na etiologia das lesões[8].

Numa revisão da literatura realizada por Alleague e colaboradores[62], apontou-se a gestação como um fator de risco para o desenvolvimento de AC.

Outros mecanismos etiopatogênicos descritos foram: lesões induzidas por drogas, papilomavírus humano (HPV), relacionados com disrafismo espinhal oculto, acromegalia ou prolactinoma. A exposição da pele a traumas repetidos de baixa intensidade podem estimular a proliferação celular e espessamento da epiderme e promover o surgimento de AC[62].

O aumento de fibromas moles durante a gestação pode estar relacionado ao aumento de hormônios esteróides. Em um estudo recente, Yilmaz e colaboradores[63] relataram que 40% das mulheres grávidas com AC e AN apresentaram DM gestacional, enquanto apenas 14% das mulheres sem essas lesões cutâneas apresentaram DM na gravidez.

Pacientes obesas podem apresentar uma diminuição da testosterona livre e um aumento dos níveis de estradiol[64]. Obesas com síndrome X que apresentam altas taxas de andrógenos séricos e diminuição na globulina carreadora de hormônios sexuais, suportam a hipótese que estrógenos e andrógenos estão envolvidos no surgimento de lesões cutâneas como os AC[31].

Em 2010, El Safoury e colaboradores[61], realizaram um estudo para avaliar a presença de receptores de andrógenos e estrógenos ± e ² nos AC. Neste estudo, a alta prevalência desses receptores nos acrocórdones, demonstrou uma forte evidência da participação desses hormônios sexuais no surgimento das lesões cutâneas e propuseram que a região do pescoço seria uma área dependente de andrógenos, bem como as axilas e a virilha[59].

As infecções pelo HPV estão associadas na gênese de diversas lesões benignas. Em estudo realizado por Dianzani[65] em 1998 detectou-se a presença de DNA de HPV 6/11 em 88% dos acrocórdones, porém a quantidade de DNA era

pequena nestes casos. Gupta[66] realizou PCR para HPV tipo 6 e 11 em AC, encontrando a presença de DNA de HPV 6/11 em 48.6% dos fibromas moles. Porém mais estudos são necessários para confirmar o papel do HPV na formação dos AC[66].

Rezzonico e colaboradores[47] concluíram que indivíduos com AC possuem uma alta prevalência de nódulos tireoidianos e tireóide com volume aumentado. Isso pode ocorrer, pois os acrocórdones e as alterações tireoidianas podem estar associadas ao alto nível de insulina circulante[67].

2.4 Outra dermatose associada à resistência insulina: Acantose Nigricante

O mecanismo pelo qual a resistência à insulina causa a acantose nigricante (AN) é complexo. A presença de RI importante produz hiperinsulinemia compensatória. A insulina sérica aumentada interage com os receptores do fator de crescimento IGF-1, desencadeando proliferação de queratinócitos e fibroblastos (Figura 8). A AN é causada por fatores de estímulo epidérmico no queratinócito e proliferação de fibroblastos na derme. Nas formas ligadas à malignidade, substâncias secretadas pelo tumor agiriam como fatores estimuladores[68]. Postula-se que o TGF-alfa produzido pelo tumor, o qual é similar ao EGF, seja importante na gênese da AN maligna[30, 46, 68].

O EGF é um importante mediador do crescimento dos queratinócitos *in vitro*, de forma que tanto o receptor do EGF quanto o EGF estão em quantidade exagerada na epiderme hiperproliferada. O EGF precisa da interação com o fator de crescimento insulina-símile/somatomedina (IGF-1) ou com altas doses de insulina para a proliferação dos queratinócitos. O receptor IGF-I localiza-se na camada basal

da epiderme sugerindo a participação de IGF-1 e do EGF na regulação do crescimento epidérmico e na patogênese das doenças cutâneas hiperproliferativas[69].

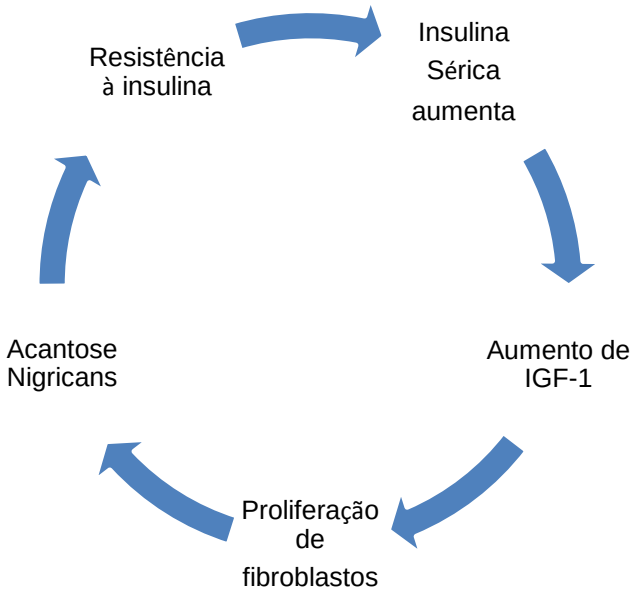


Figura 8. Mecanismo desencadeador das lesões de acantose nigricante associada à endocrinopatia.

A prevalência da AN em populações não selecionadas varia entre 7 a 74%, de acordo com idade, raça, frequência do tipo, do grau de obesidade e da concomitância com endocrinopatia[70, 71]. Em 34 indivíduos obesos de ambos os sexos, numa população predominantemente de negros (59%), Hud e colaboradores[72] descreveram prevalência de AN em 74% dos pacientes e demonstraram nítida predominância da AN em mulheres pardas e negras em relação às brancas.

Indivíduos com pele fototipo IV têm maior prevalência de AN no pescoço, em comparação com aqueles com fototipos II e III. Porém, o achado de AN em pacientes fototipo II mostrou alta especificidade e altos valores preditivos positivos

para a resistência à insulina. Assim, a AN pode ser considerada um importante marcador para resistência à insulina em fototipos mais baixos[73].

Stoddart e colaboradores[74] e Kong e colaboradores[75] reconheceram a AN como um fator de risco independente, associado à hiperinsulinemia, ao desenvolvimento do DM. Kong e colaboradores[75] demonstraram que crianças com história familiar de diabetes tipo 2 apresentavam mais AN, e que nos pacientes com hipertensão e IMC elevado, a acantose foi mais freqüente. Este autor concluiu que a detecção precoce da AN pode ser importante na detecção de indivíduos com risco de DM tipo 2 podendo o médico aconselhar a modificar o estilo de vida do paciente reduzindo o risco de desenvolver a doença[75].

Muñoz-Pérez e colaboradores[76] aventaram que pequena quantidade de insulina no tecido pode se traduzir em proliferação de células cutâneas causando AN.

Vários outros trabalhos tem demonstrado associação da presença de AN com resistência à insulina, como o de Yamazaki e colaboradores em 2003[77], que ao pesquisar tal relação em crianças japonesas obesas, obteve associação positiva destes achados. Stuart e colaboradores[70] em estudo com 89 afro-americanos com AN observaram frequência de 21,3% de DM tipo II. Burke e colaboradores[78] também observaram níveis de insulina de jejum maiores em pacientes com AN.

Sadeghian e colaboradores[46] investigaram a presença de resistência à insulina em mulheres obesas com e sem AN, de forma que as lesões cutâneas mostraram ser um marcador de resistência à insulina. O valor médio do índice HOMA-IR foi 3.5 ± 1.9 e 2.6 ± 0.9 um/ml em pacientes com e sem acantose

nigricante, respectivamente ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística do perfil lipídico, triglicerídeos e presença de hipertensão entre os dois grupos[46].

Copeland e colaboradores[79] investigaram a associação da AN e da resistência à insulina em crianças. Estes autores demonstraram que a intensidade da apresentação dermatológica mostrava correlação com os valores do HOMA[79]. Ainda os autores observaram que a AN apresentou-se como um fator de risco independente para o desenvolvimento de resistência à insulina[79]. Wiegan e colaboradores[80], observando uma amostra composta por 491 crianças e adolescentes obesos, também concluíram que a presença de AN está relacionada a valores mais altos de HOMA. Araújo e colaboradores[81], além de demonstrar que o índice HOMA foi mais elevado acompanhando a intensidade da AN, indicaram que estas alterações da insulina são encontradas mais frequentemente em mulatos e negros, baseados na sua amostra composta por mulheres obesas. Assim, os autores sugerem que a AN seja um marcador de risco elevado para o desenvolvimento de diabetes mellitus não insulino-dependente. Neste estudo não foram encontradas diferenças estatísticas nas proporções de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides na população com e sem AN[81].

Em Galveston, Texas, 28% dos casos de pessoas com peso maior que 120% do peso ideal apresentaram acantose nigricante[69]. Outro estudo em adultos, no Texas, demonstrou correlação da severidade da obesidade com a prevalência de acantose nigricante[72].

A AN também se mostrou mais comum em mulheres com SOP. Charnvises e colaboradores[82] confirmaram em seu estudo que a AN é um marcador cutâneo da presença de intolerância a glicose e resistência à insulina mulheres com SOP.

Hirschler e colaboradores[83] discordam através de seu estudo com 1.250 crianças hispânicas, afirmando que a AN poderia refletir a obesidade e não se apresentaria como um fator independente de resistência à insulina. Neste estudo, o IMC dos pacientes com AN foi maior, mas a resistência à insulina e o HOMA não variaram quando comparados ao grupo sem acantose[83].

Caceres e colaboradores[84], ao pesquisar em crianças e adolescentes obesos a relação entre a resistência à insulina e a AN, não encontraram associação estatisticamente significativa, sendo que a AN foi encontrada em 70% dos pacientes com resistência a insulina e em 54% dos pacientes sensíveis à insulina.

Scott e colaboradores[85] sugeriram que a AN em crianças obesas seja um marcador de disfunção metabólica sendo que estes pacientes possuíam um risco aumentado ao desenvolvimento de DM tipo 2. Neste mesmo estudo os valores da proteína C reativa (PCR) apresentaram-se mais elevados no grupo com AN, podendo sugerir aumento na resposta inflamatória sistêmica. Este achado não pôde ser comprovado devido ao método utilizado para detecção da PCR não ter sido o mesmo em todos os casos[85].

Hardin[86] em 2006 sugeriu investigação do DM centrado na presença da AN no nível da atenção primária. Guran e colaboradores[17] em 2008 sugeriram que AN pode ser um marcador para síndrome metabólica (Síndrome X) em crianças obesas. Logo, crianças com este achado precisam de investigação para a Síndrome X[17]. A identificação da síndrome metabólica em idade pediátrica sugere um desenvolvimento precoce de complicações cardiovasculares na idade adulta. Existe uma correlação positiva entre o IMC na adolescência e o risco de doença coronariana em adultos[87]. Facilmente identificável, a AN torna-se um sinal para

rastreamento de resistência a insulina e do DM não insulino-dependente, com consequentes modificações no estilo de vida e instituição de tratamento precoce[75].

Miura e colaboradores[88] demonstraram que AN em crianças e adolescentes japoneses obesos é um marcador clínico útil para a gravidade da obesidade, sendo os genes B2ADR Gly16 e B3ADR Arg 64 associados sinergicamente com AN nas crianças e adolescentes obesos. O mesmo grupo demonstrou índices de TGP maiores, refletindo maior acúmulo de gordura (esteatose) no fígado dos pacientes com AN[89]. Os receptores adrenérgicos b2 e b3 (B2ADR e B3ADR) possuem um papel importante na estimulação da termogênese e na ativação de lipídios mobilizando as reservas de gordura[88]. Um polimorfismo, Trp64Arg, no B3ADR tem sido implicado na obesidade, início precoce do diabetes tipo 2, resistência à insulina e a uma tendência a ganhar peso[90]. Recentemente, dois polimorfismos comuns no B2ADR, Gly16Arg e Gln27Glu, também foram implicados na regulação do peso corporal, obesidade ou diabetes tipo 2 em alguns grupos de pacientes[91].

A AN pode ser tratada de forma simples, melhorando hábitos de vida com pratica de atividade física regular e dieta. Em casos mais extremos podemos utilizar de tratamento medicamentoso como o uso de octreotide (análogo da somastotatina) e análogos do colecalciferol (vitamina D3, calcipotriol tópico, retinóide e metformina)[30]. A metformina reduz a produção de glicose pelo aumento da resposta periférica da insulina[92]. O uso combinado de metformina os tiazoglidionas, que aumenta a sensibilidade à insulina no músculo periférico, também apresentou bons resultados[93].

No Texas (EUA), a agência regional de educação criou um programa de detecção do DM tipo 2 em crianças de 1ª,3ª, 5ª e 7ª séries das escolas públicas e

privadas, através da constatação da presença de AN na pele dos alunos, entre os anos entre 1999 e 2003. O programa era simples e de fácil detecção já que o exame foi apenas clínico, não dependendo de procedimentos invasivos. As crianças foram diagnosticadas e o fato foi comunicado aos pais que foram orientados a procurar o médico para um exame detalhado[94].

2.5 Fatores de crescimentos e incretinas na resistência à insulina

2.5.a Fatores de Crescimento

Há um grande número de polipeptídeos, os chamados fatores de crescimento, alguns dos quais atuam nos muitos tipos celulares e outros têm alvos celulares restritos. Além de estimular a proliferação celular, os fatores de crescimento podem ter efeitos na locomoção, contratilidade, diferenciação e angiogênese celulares, atividades que podem ser tão importantes quanto os efeitos de sua promoção ao crescimento.

Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)

O EGF é mitogênico para uma variedade de células epiteliais, hepatócitos e fibroblastos. É amplamente distribuído nas secreções e nos líquidos teciduais, como suor, saliva, urina e conteúdos intestinais. Nas cicatrizações de ferimentos da pele, o EGF é produzido por queratinócitos, macrófagos e outras células inflamatórias que migram para dentro da área[69].

O EGF liga-se a um receptor (EGFR) com atividade tirosina quinase intrínseca, deflagrando os eventos de tranducção de sinais descritos posteriormente.

O EGFR é, de fato, uma família dos receptores de membrana da tirosina kinase que respondem ao EGF, TGF-alfa e outros ligantes da família EGF. O principal EGFR é referido como EGFR1, ou ERB B1. O receptor ERB B2 (também conhecido como HER-2/Neu) recebeu grande atenção porque é superexpressado nos cânceres de mama e é um alvo terapêutico[69].

O EGF é um importante mediador do crescimento dos queratinócitos *in vitro*, e tanto o receptor do EGF quanto o EGF estão em quantidade exagerada na epiderme hiperproliferada. O EGF precisa da interação com o fator de crescimento de insulina/somatomedina (IGF-1) ou com altas doses de insulina para a proliferação dos queratinócitos. O receptor IGF-1 localiza-se na camada basal da epiderme sugerindo a participação de IGF-1 e EGF na regulação do crescimento epidérmico e na patogênese das doenças cutâneas hiperproliferativas[69].

O EGF-R foi quantificado em ceratoses seborréicas e acrocórdones de mulheres com e sem a síndrome do nevo displásico. A concentração de EGF-R foi surpreendentemente elevada em queratinócitos suprabasais de ceratoses seborréicas e acrocórdones de pacientes com a síndrome do nevo displásico que estavam grávidas ou tomavam hormônios esteróides quando comparada a concentração de EGF-R em ceratoses seborréicas de outros pacientes. Em contrapartida, o padrão de distribuição de receptores de EGF nos acrocórdones não se correlacionou com a história de crescimento destas lesões em pacientes normais. Estes dados sugerem que esteróides sexuais podem afetar o metabolismo de EGF de lesões benignas epidérmicas hiperproliferativas, particularmente em pacientes com a síndrome do nevo displásico[95].

Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF)

Os FGFs (ácido e básico) são uma classe de proteínas de ligação a heparina que induzem quimiotaxia, possuem atividade mitogênica e angiogênica[67]. O FGF tem sido demonstrado mitogénico para uma variedade de tipos de célulares, dentre eles: fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais, condrócitos, osteoblastos[96]. Os FGFs também estimulam a produção de fibronectina e alguns tipos de colágeno pelas células endoteliais. Os efeitos mitogénicos do FGF sobre endotelial células sugerem que o FGF desempenha um papel importante na angiogênese.

Recentemente, em um estudo que avaliou a cicatrização de úlceras de pele em suínos demonstrou que o bFGF exógeno em aplicações únicas ou múltiplas acelerou a taxa de reepitelização em 20% nesses animais[97]. Estes resultados in vivo parecem corroborar com a resposta estimulatória anterior de FGF sobre os queratinócitos *in vitro*[98, 99].

Fator de Crescimento de Insulina símile (IGF)

Os IGFs (1 e 2) ou somatomedinas podem ser encontrados no plasma em alta concentrações em um estado inativo vinculado a proteínas transportadoras com maior peso molecular. Além de encontrarmos IGF no plasma, outras fontes dos IGFs incluem o fígado, rins e fibroblastos. As somatomedinas são mediadoras de promoção do crescimento hormonal[100], bem como realizam um importante papel no crescimento fetal[101]. O IGF-1 também pode ser chamado de somatomedina C.

O IGF-1 pode estimular a replicação celular. Semelhante a outros fatores de crescimento, o IGF-1 interage com muitos tipos celulares e outros componentes do

tecido auxiliando na cicatrização de feridas. IGF-1 é um agente mitogênico potente em cultura de queratinócitos de ratos[102].

Os IGF foram a princípio identificados por mediar as ações do GH (hormônio de crescimento) e em seguida por sua atividade insulina-*like* [102]. Os IGF podem ser marcados (expressos) nos fibroblastos dérmicos, nos melanócitos epidérmicos e nos queratinócitos basais. Os queratinócitos *in vivo* produzem IGF em condições especiais, incluindo crescimento fetal e cicatrização de feridas [101,102].

Alterações na produção do IGF na epiderme foram encontradas na psoríase, nos quelóides, nos nevos displásicos e no melanoma primário [102].

2.5b Incretinas

Em 1932, La Barre propôs o nome incretina para hormônio extraído da mucosa intestinal que causava hipoglicemia e sugeriu que esta seria uma possível terapia para o DM [103].

Alguns pesquisadores questionaram a existência das incretinas, mas em 1970 o GIP foi isolado na mucosa intestinal [103].

Peptídeo Insulinotrópico Glicose-dependente (GIP)

O GIP foi originalmente descrito como inibidor da secreção ácida gástrica e da motilidade gastrointestinal, recebendo a denominação de peptídeo inibidor da gastrina[103]. Após, outros estudos demonstraram que o GIP exerce efeitos dependentes da glicose, estimulando a secreção de insulina, garantindo assim a captação de glicose nos tecidos[104, 105]. Portanto, seu papel mais relevante parece ser

o de agente insulinotrópico com um efeito estimulante sobre a liberação e síntese de insulina. Os efeitos do GIP sobre a liberação de insulina não ocorrem se níveis plasmáticos de glicose estiverem normais. Portanto, para o GIP mediar a secreção de insulina é necessário o aumento dos níveis de glicose (ingestão de carboidratos)[105].

O receptor do GIP (GIPR) é uma proteína pertencente a família das secretina. O GIPR é amplamente distribuído nos órgãos periféricos, incluindo o pâncreas, intestino, tecido adiposo, coração, córtex adrenal e cérebro, sugerindo que possam existir outras funções. O GIP foi apontado como um coadjuvante na patogênese da diabetes e obesidade. Além de estimular a liberação de insulina, o *GIP demonstrou amplificar o efeito da insulina em tecidos-alvo*[106].

Além de ser insulinotrópico, GIP está envolvido no metabolismo da gordura em adipócitos: aumenta a insulina estimulando a incorporação de ácidos graxos em triglicerídeos, estimula a atividade lipoproteína da lipase, modula a síntese de ácidos graxos[106], e *promove a proliferação celular*[107, 108]. Concentrações elevadas de GIP têm observadas em pessoas obesas[109, 110].

O GIP também inibe o glucagon estimulando a lipólise, aumentando a atividade da lipase e promovendo o acúmulo de triglicérides[111, 112]. Além disso, aumentou a afinidade dos receptores de insulina, e o aumento da sensibilidade à insulina estimulou o transporte de glicose. O estudo do GIP tem interessado pesquisadores que estudam diabetes e obesidade. Pesquisas utilizando camundongos sugerem que o GIP seja um fator de promoção de obesidade[113]. Em ratos normais, uma dieta rica em gordura levou ao aumento da massa dos adipócitos e resistência à insulina, enquanto em ratos com grande quantidade de

receptores de GIP (GIPR), alimentados com alto teor de gordura, não se tornam obesos e nem desenvolveram resistência à insulina. Consistente com estes resultados, a administração diária do antagonista para o GIPR (Pro3) em camundongos melhora a tolerância à glicose, impede o início de resistência à insulina e previne anomalias da estrutura das ilhotas pancreáticas, sugerindo que o antagonismo do GIPR poderia ser um meio eficaz de controlar peso corporal[114] (Figura 9).

No entanto, deve-se estar ciente de que a homeostase da glicose corporal pode ser afetada, porque o antagonismo de ação GIP também leva a níveis sanguíneos elevados de glicose, como relatado a partir de vários estudos com animais[115, 116]. Estudos adicionais são necessários para delinear e caracterizar o significado biológico do GIP ou seus análogos. Existe a necessidade de mais estudos com o GIP para determinar exatamente o seu papel na etiologia do DM e obesidade.

Em um estudo recente, demonstraram que o GIP sérico elevado está relacionado com hiperinsulinemia, enquanto no DM tipo 2 existe uma falência de secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas[117].

O efeito insulinotrópico do GIP tem sido demonstrado não somente em pacientes diabéticos, mas também nos parentes de primeiro grau desses pacientes mesmo que tenham níveis glicêmicos normal e sejam tolerantes a glicose. Logo o defeito no GIP deve ser um defeito genético primário nos pacientes com DM tipo 2.O estudo do GIP colabora para elucidação da fisiopatologia do DM tipo 2[117, 118].

O aumento do GIP relatado em pacientes com síndrome metabólica pode estar relacionado ao prejuízo do efeito insulinotrópico desse hormônio nos pacientes com a síndrome.

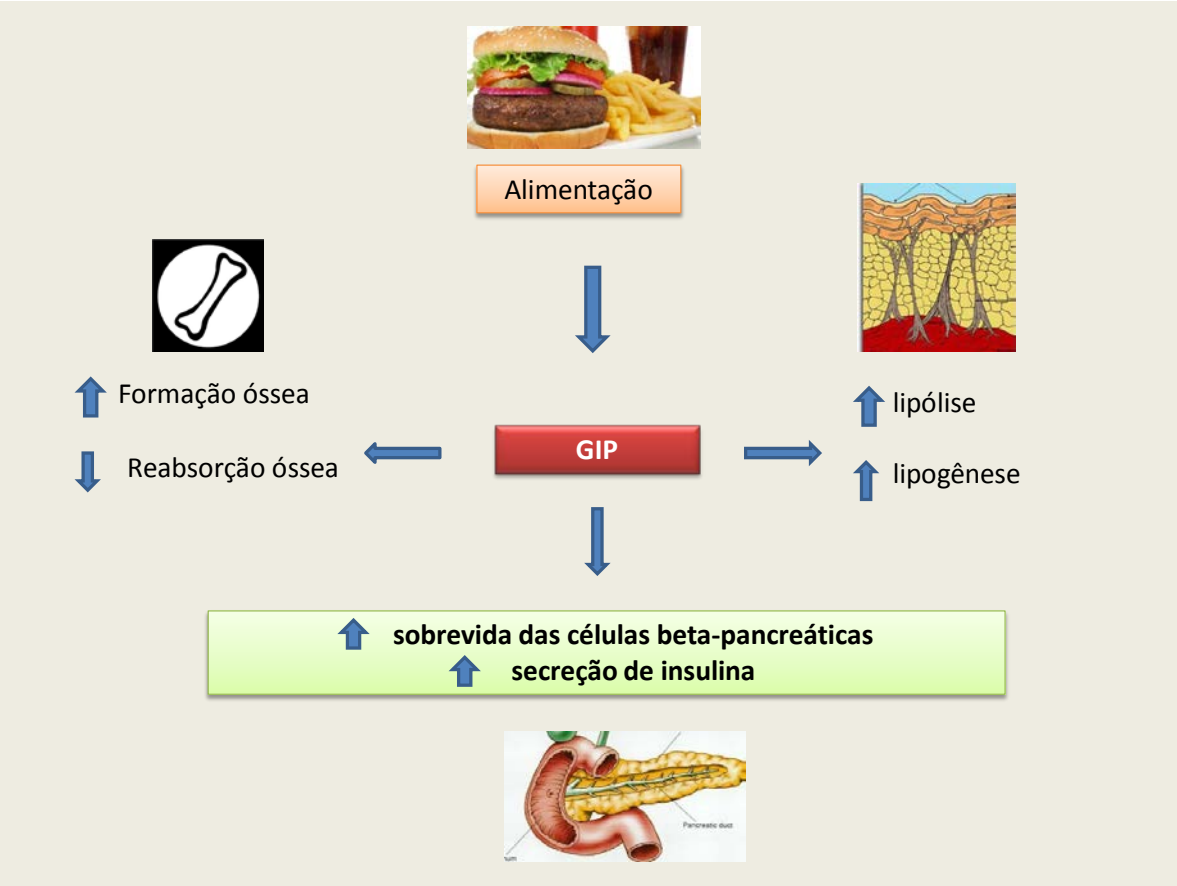


Figura 9. Atuação do Peptídeo Insulinotrópico dependente de Glicose (GIP) nos tecidos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

a. Identificar a expressão do GIP (Peptídeo Insulinotrópico dependente de glicose) e IGF-1 (Fator de Crescimento de Insulina) nas lesões de acrocórdones e na pele sã (sem lesões) dos mesmos pacientes, bem como na pele de pacientes sem acrocórdones (indivíduos controles) por meio de análises imuno-histoquímicas, correlacionando esta expressão com o fenômeno de resistência a insulina.

3.2. Objetivos Específicos

b. Avaliar a presença de resistência à insulina, através do Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA), em pacientes obesos e não obesos portadores de acrocórdones;

c. Correlacionar a intensidade de marcação epidérmica para IGF-1 e GIP com a presença ou não de resistência a insulina nos indivíduos com acrocórdones;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

O presente trabalho tratou-se de um estudo transversal, em que as amostras foram selecionadas por conveniência, ou seja, incluiu todos os pacientes atendidos no ambulatório do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) no ano de 2010, com achado de múltiplos acrocórdones no exame físico que tinham interesse de remover as lesões.

Foram excluídos do estudo:

- Indivíduos menores que 18 anos de idade;
- Gestantes;
- os pacientes que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- os pacientes que já possuíam DM confirmado ou que estavam em uso de medicações que alteram o metabolismo de glicose;
- pacientes, cuja a lesão, ao exame histopatológico, não foi característico (compatível) de acrocórdone.

Todos os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), aprovado pelos comitês CEPSH da UFSC e CAPpesq do HC-FMUSP (protocolo de aprovação 327058) (Anexo 1).

4.2 Preenchimento de questionário

O preenchimento do questionário (Anexo 2) foi realizado pelo próprio pesquisador, incluindo dados como idade, raça, gênero, tipo de dermatose, medicações em uso, história familiar de diabetes, e comorbidades.

Neste estudo, foram considerados os seguintes conceitos:

- Idade: Idade em anos do paciente, em anos completos, no período do diagnóstico.

-Gênero: Feminino ou masculino.

-Etnia: grupo étnico do paciente, sendo classificados em branco, negro, pardo, amarelo e indígenas, conforme classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE[119].

Segundo o censo de 2010 (IBGE) a população brasileira está dividida da seguinte forma: pardos: 43,1%, brancos 47,7%, negros 7,6%, índios 0,4% e amarelos 1,1%[119].

4.3 Exame clínico

Além de análise das lesões de pele, os pacientes foram avaliados quanto ao peso e altura para posterior cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), conforme fórmula abaixo. Essas medidas foram realizadas sempre na mesma balança para evitar viés de aferição.

- Índice de Massa Corporal (IMC):

Este parâmetro foi calculado dividindo o peso do paciente (kg), pela altura ao quadrado (cm):

$$IMC = \frac{peso\ (kg)}{altura\ (cm)^2}$$

A partir desse resultado, os pacientes são classificados, de acordo com a OMS [18] como:

Eutrófico: IMC >18,5 KG/m^2 e <25 kg/m^2

Sobrepeso: IMC >25 kg/m^2 e < 30 kg/m^2

Obesidade : IMC e 30 kg/m^2

4.4 Exames Bioquímicos

Foram realizados exames para verificação da insulina sérica, glicemia de jejum, colesterol total, LDL, HDL, Triglicerídeos, TGO (AST), TGP (ALT), GGT e Fosfatase alcalina. Todos estes exames foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário (UFSC), com os pacientes respeitando jejum de 12 horas.

Para comparação dos exames bioquímicos, foi utilizado grupo controle pareado para sexo e idade. O grupo foi formado por voluntários, funcionários do Hospital Universitário de Florianópolis, que não apresentavam lesões cutâneas (AC), nem historia de DM.

4.5 Biopsias de pele em dois locais (área acometida e não acometida)

As biópsias foram realizadas no setor de cirurgia ambulatorial do Hospital Universitário (UFSC), utilizando anestesia local com xilocaína 2% sem vasoconstritor.

A biópsia foi realizada pelo próprio pesquisador, em duas regiões do mesmo paciente, utilizando-se *punch* de 3 mm ou *shaving* (barbiérese). Foram retirados os acrocórdones e uma das lesões enviada para análise histopatológica, logo em seguida, no mesmo paciente, em área do corpo não-exposta era retirado, um fragmento de 3mm de pele sã (*punch* de pele sem lesão). O fragmento de pele da área não-exposta foi retirado da mesma área da qual havia sido retirado o acrocórdone, ou seja, se o acrocórdone era na axila o outro punch era realizado na axila contra lateral ou pele adjacente sem lesão.

Como grupo de indivíduos controles (normais) foram coletados dez fragmentos de pele normal, de pacientes sem acrocórdones e sem resistência à insulina. Esses fragmentos foram cedidos pela equipe de cirurgia plástica do Hospital Universitário-UFSC, e são provenientes de cirurgias como otoplastia, blefaroplastia, abdominoplastia e mamoplastia, onde o excesso de pele foi retirado.

Os fragmentos de pele foram embebidos em formol 10% para fixação e enviados para o Setor de Patologia do Hospital Universitário da UFSC. As lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina-eosina (HE) e analisadas pelo mesmo dermatopatologista.

4.6 Análise imuno-histoquímica

As análises imuno-histoquímicas dos pacientes com acrocórdones (pele com acrocórdone e pele controle do mesmo paciente) ou da pele de indivíduos normais (grupo controle) foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

A análise imuno-histoquímica da pele foi realizada precedida de processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 3-4 µm foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, preparadas através da imersão das mesmas em solução de ATPS (3-amino-propil-trietoxisilano; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona (v/v). Em seguida, as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram mantidas em estufa, durante 1 h, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para fixação dos mesmos. Após fixação, as secções histológicas foram desparafinizadas através de imersões consecutivas em xilol e reidratadas por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v), durante 20 min, com posterior lavagem em água destilada.

Previamente à incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas à recuperação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0, durante 35 min, em banho-maria ajustado para 95-98°C. Logo após, ainda como parte do

processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada e PBS. A imunodetecção das proteínas de interesse foi realizada utilizando os anticorpos anti−IGF-1 e anti-GIP. Os anticorpos utilizados foram anti-IGF1 humano e anti-GIP humano, todos de coelho e policlonais com diluições de 1:150 e 1:600, respectivamente. A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12–16 h, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho, dependendo da natureza do anticorpo primário (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), em câmara úmida durante 50 min à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e a detecção foi realizada utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation). Após 30 min de incubação das lâminas em câmara úmida com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase à temperatura ambiente, as mesmas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3´-diaminobenzidina (3,3´,4,4´-tetraaminobifeniltetrahidrocloreto) (DAB, Sigma-Aldrich) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Merck).

Posteriormente, foi realizada contra-coloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, no qual o corte histológico foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário).

4.7 Análise de Imagem

Os resultados foram documentados utilizando uma câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA), sendo obtidos de 3-4 imagens em objetiva de 200x de cada lesão e/ou pele normal avaliada. O programa de análise de imagem utilizado foi o ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java)* (Figura 10). Este programa permite determinar distâncias, medidas de intensidade de imunocoloração, contagem de células totais, contagem de células marcadas e porcentagem de células marcadas[120-122].

Utilizando o programa, foi realizado recorte da epiderme (excluindo derme, folículos pilosos e queratina), calculada a área total (Figura 11) da epiderme e, posteriormente, era calculada área de queratinócitos imunomarcada. Para cada marcador (IGF e GIP) foram selecionados quais as tonalidades de marrom deveriam ser consideradas positivas (ferramenta de *threshold color*) (Figura 12) Os resultados da imunoreatividade foram expressos em porcentagem de área positiva (Figura 13). Todas as imagens foram adquiridas na mesma resolução, no mesmo dia e com a mesma luz para evitar erros na aferição das mesmas.

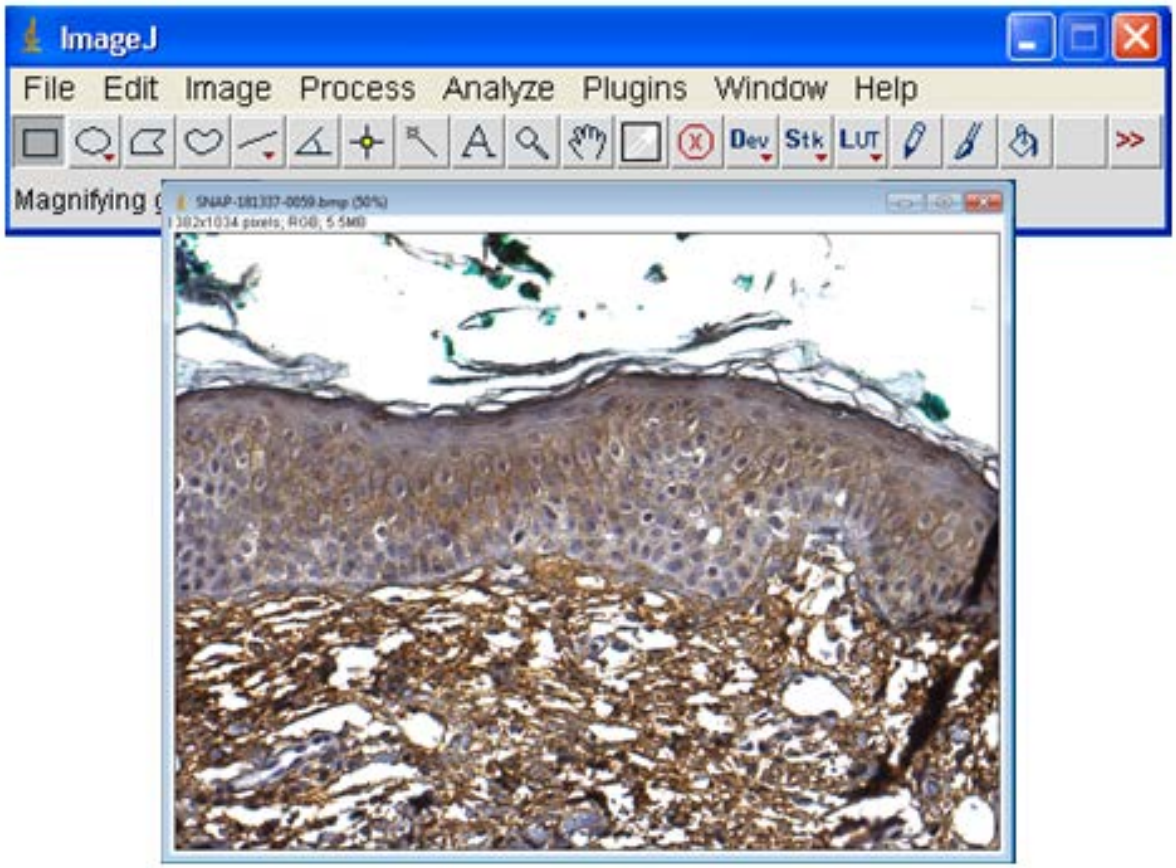


Figura 10: Programa ImageJ, imagem de pele corada em HE (hematoxilina-eosina) ainda contendo a derme e camada superficial de queratina.

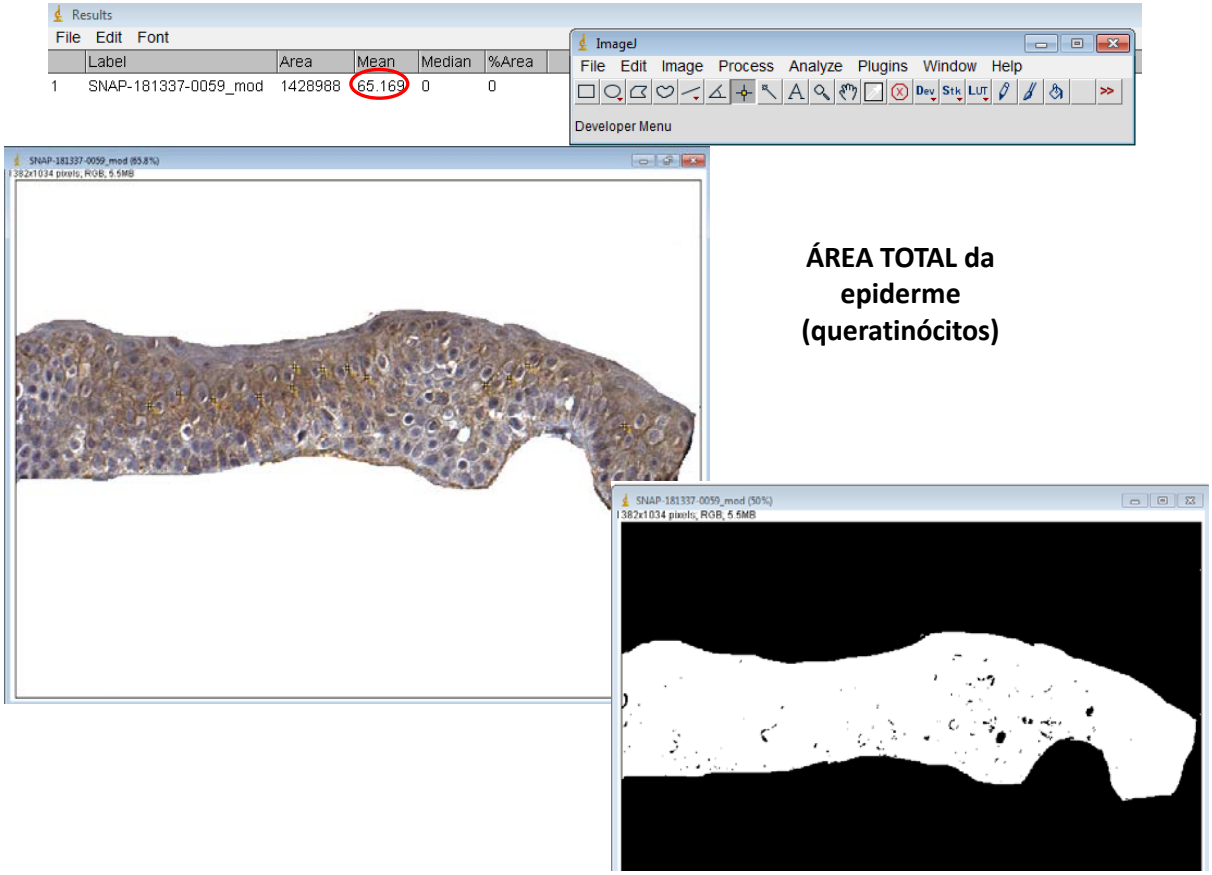


Figura 11: Recortes da epiderme para determinar a área total, através da ferramenta de análise de medidas do programa Image J.

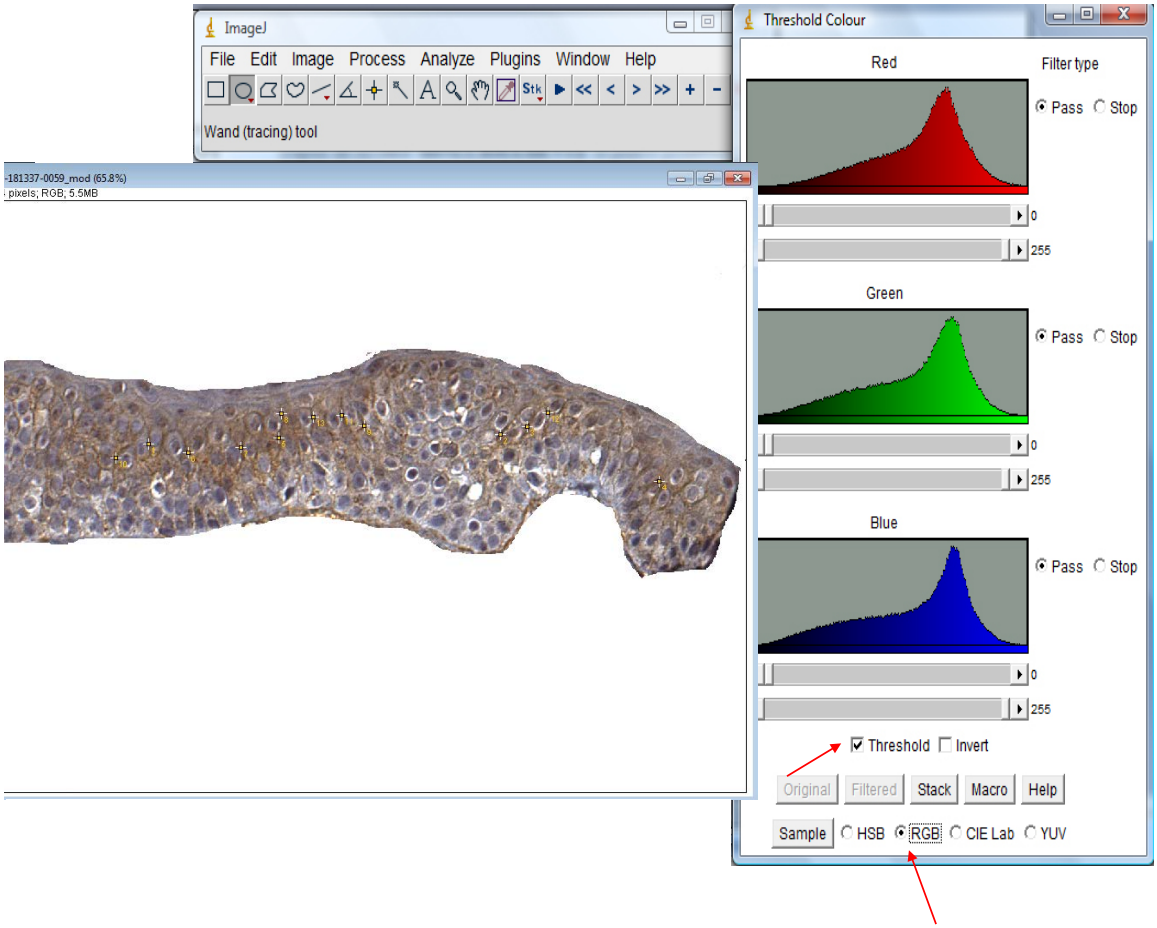


Figura 12: Realização do *treshold* com marcação dos tons de marrom.

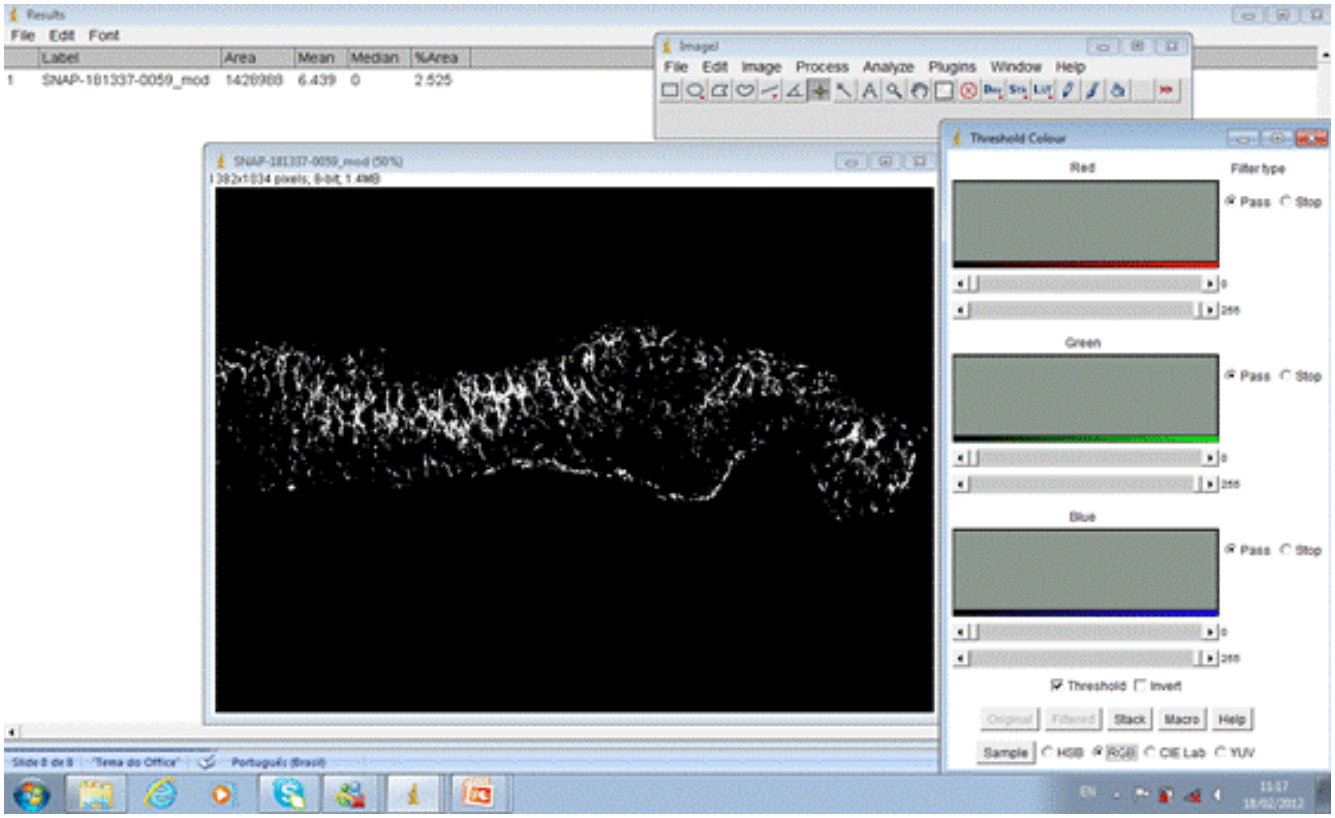


Figura 13: Cálculo da área imunomarcada na epiderme, após especificados quais os tons de castanho representam a imunomarcação do GIP (ferramenta de análise de medidas do programa Image J).

4.8 Análise estatística

Foi realizado inicialmente o teste de Shapiro-Wilk para identificar a normalidade da distribuição das variáveis dos exames bioquímicos. Apresentaram distribuição normal as variáveis: LDL, HDL e fosfatase alcalina (FA). As demais se apresentaram assimétricas.

Foi utilizado o teste t de Student para comparação entre as médias das variáveis com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para comparação entre as medianas, para as variáveis com distribuição assimétrica.

Os grupos foram separados em pacientes com lesões (AC), e grupo controle (pacientes sem lesões) para a comparação dos exames bioquímicos.

Posteriormente os pacientes foram estratificados em grupos de obesos e não obesos para comparação.

O programa utilizado para as análises estatísticas foi o *Stata 11.0*.

Após a determinação da % de área marcada pela imuno-histoquímica na epiderme, foi realizado teste ANOVA para comparação entre as médias dos três grupos: normal (pele remanescente de cirurgia plástica), lesão (fragmento de pele de acrocórdon) e controle (pele controle dos indivíduos com lesão).

5. RESULTADOS

Neste estudo, foram incluídos 57 pacientes com acrocórdones (AC), desses 42 eram do sexo feminino (73%). A idade média dos pacientes foi de 49 anos, sendo que 41 pacientes (71,9%) eram brancos (Tabela 1). A descrição do grupo de pacientes estudados está detalhada na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição da amostra dos pacientes com AC. (* IBGE[119])

Variável	n	%	IC 95%
Genero			**-**
Masculino	15	26,3	14,5-38,1
Feminino	42	73,7	61,9-85,5
Etnia*			**-**
Branco	41	71,9	59,9-83,9
Pardo	10	17,6	7,4-27,7
Preto	6	10,5	2,3-18,7
Obesos			
Não	25	47,2	33,3-61,1
Sim	28	52,8	38,9-66,7

Dos pacientes da amostra, 25 (47,2%) eram obesos, ou seja, IMC e 30 kg/m^2, e 28 (52,8%) não obesos (sobrepeso ou normais). Quatro pacientes não foram pesados e medidos na balança do hospital, apenas referiram suas medidas, portanto suas medidas de peso e altura foram desconsideradas. O IMC médio encontrado foi de 31,5 kg/m^2.

Dos pacientes com AC, 11 (19,3%) também possuíam lesões de acantose nigricante (AN) nas dobras cutâneas.

5.1 Resultados dos exames bioquímicos

Para comparar os valores de exames bioquímicos, utilizamos um grupo controle de 16 pacientes, pareados para idade e sexo, sem história de diabetes, que não utilizavam medicações que alterassem a glicemia e sem lesões cutâneas (AC). Os exames foram comparados entre os grupos com lesões (AC) e grupo controle. Nos exames, glicemia de jejum, insulina de jejum e triglicerídeos e GGT, foi maior em pacientes com lesões quando comparados ao grupo controle (p < 0.05) (Tabela 2 e Figura 14)

Tabela 2. Exames laboratoriais, diferença entre os grupos com lesões cutâneas (AC) e grupo controle (indivíduos sem AC).

Exame bioquímico	Grupo Lesões		Grupo Controle		
	Média	DP	Média	DP	p
Glicose	110.32	26.32	93.06	8.89	**0.010***
Insulina	13.03	12.86	6.04	9.70	**0.001***
Triglicerídeos	163.45	149.75	110.53	83.84	**0.035***
LDL	116.54	35.40	125.57	30.84	0.397**
HDL	47.44	12.93	52.78	20.06	0.318**
TGO	23.78	12.64	21.37	8.06	0.465*
TGP	34.38	16.41	32.62	19.96	0.555*
GGT	38.74	40.10	31.50	47.56	**0.004***
FA	84.66	25.80	78.81	28.57	0.465**

*Teste de Mann-Whitney (mediana); ** Teste t de Student

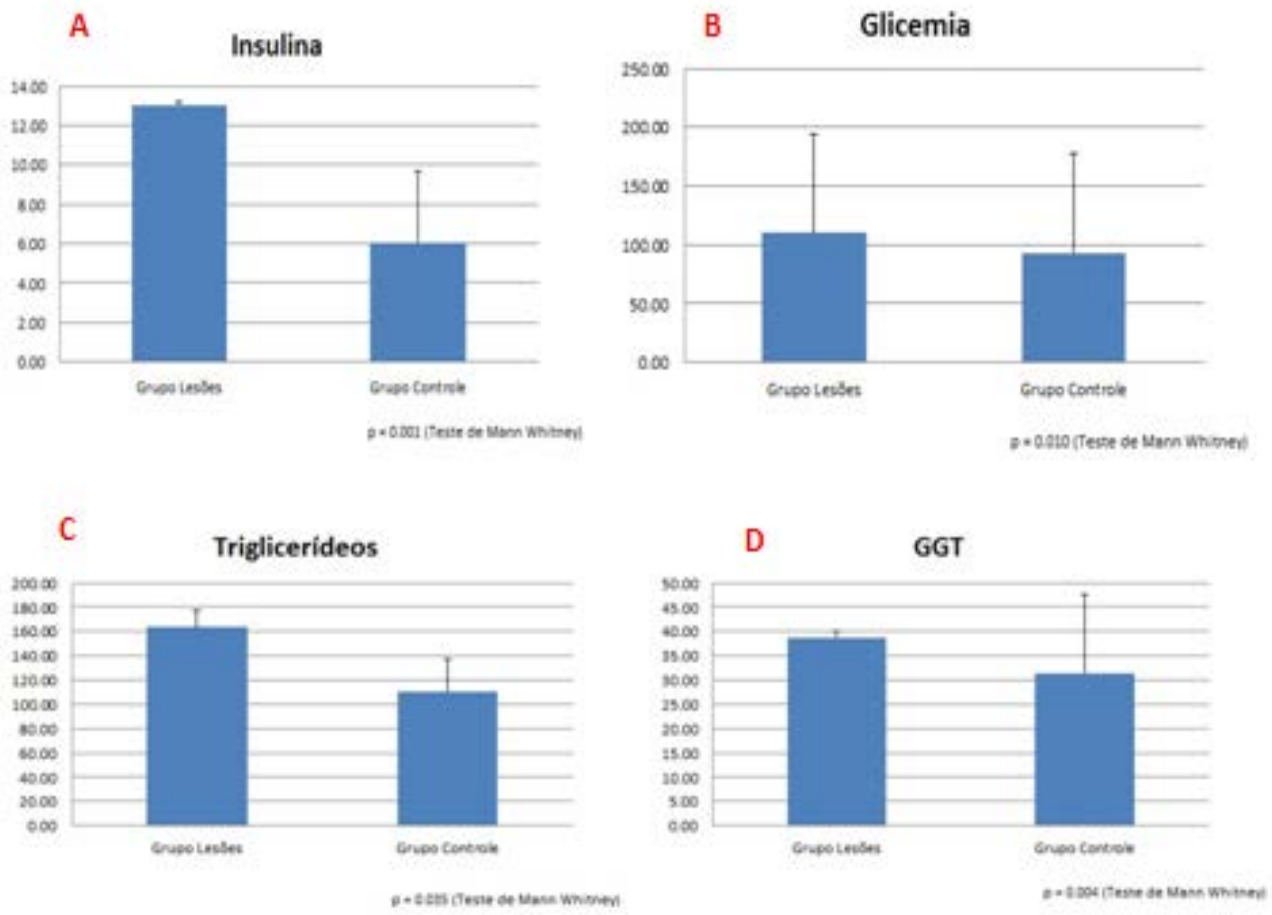


Figura 14: Gráficos demonstrando a diferença entre o grupos com lesões (AC), grupo controle com média, desvio padrão e valor de p. Os valores de glicemia de jejum, insulina de jejum, triglicerídeos e GGT, são representados nos gráficos A,B,C e D, respectivamente.

Quando estratificado em obesos e não obesos, os pacientes com AC que tinham IMC e 30 apresentaram valores de glicemia de jejum maiores que os pacientes com AC não obesos (pd0,05), quando comparados os valores dos exames bioquímicos. O índice HOMA foi maior (5,16) no grupo de obesos com AC do que no grupo de não obesos com as mesmas lesões (2.53) ($p<0.05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Exames bioquímicos e HOMA no grupo de pacientes com lesões (AC), estratificado em grupos de indivíduos obesos e não obesos.

Exames	Grupo Lesões				
	Não obeso		Obeso		
	Média	DP	Média	DP	p
Glicose	100.52	20.60	118.92	29.13	**0.021***
Insulina	14.60	11.15	12.11	12.16	0.256*
Triglicerídeos	126.22	65.26	196.59	194.61	0.135*
LDL	116.37	23.81	116.84	44.88	0.516**
HDL	48.08	14.62	46.10	11.60	0.365**
TGO	20.45	6.48	24.52	14.61	0.191*
TGP	30.35	13.67	36.65	18.26	0.237*
GGT	31.50	13.13	45.25	53.69	0.473*
FA	82.21	24.74	87.10	27.27	0.717**
HOMA	**2.53**	**2.86**	**5.16**	**5.00**	**0.036***

*Teste de Mann-Whitney (mediana); ** Teste t de Student.

O índice HOMA (Modelo de homeostase de resistência à insulina) médio dos pacientes com lesões (AC) foi maior do que o HOMA médio dos pacientes do grupo controle ($p < 0.05$) (Tabela 4 e Figura 15).

Tabela 4. Índice HOMA, média e (DP), teste t (com Graus de Liberdade) e valor de p entre grupo lesão, AN, AC comparados com grupo controle.

Variável	Grupo Lesões	Grupo Controle
HOMA (mediana ± DP)	3.78 ± 4.09	1.50 ± 2.70
p*	0.002	

*Teste de Mann-Whitney

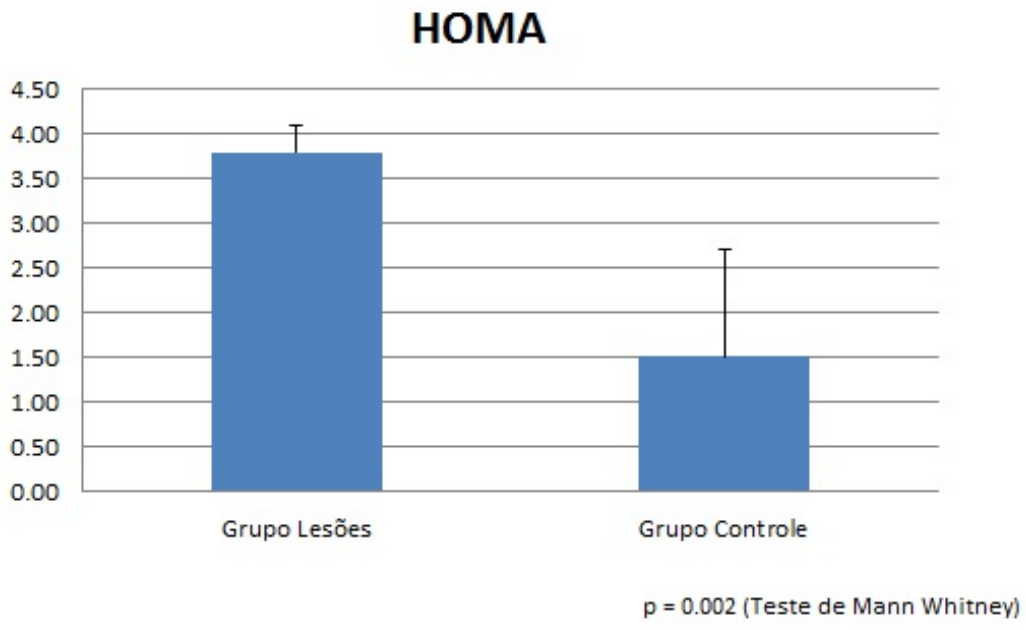


Figura 15: Gráfico com valores médios do HOMA para os grupos com lesões (AC) e grupo controle, com DP (desvio padrão) e valor de p.

5.2 Resultados imuno-histoquímicos

Realizaram-se reações imuno-histoquímicas com os anticorpos para as proteínas IGF-1 e GIP. Foram selecionados fragmentos de pele com lesões (AC) de 20 pacientes e pele aparentemente normal dos mesmos pacientes com AC para realizar as reações. Para comparação foram selecionados 10 fragmentos de pele de pacientes normais remanescentes de cirurgias plásticas (grupo controle).

Quando realizada a imunoreação com IGF-1, após o cálculo de área total de epiderme e área marcada, também não foi encontrada diferença de % de área positiva marcada entre acrocórdones, pele aparentemente normal do mesmo paciente e grupo controle. O valor de p encontrado foi de 0,9646, portanto não significativo (Figura 16 e 17). Mesmo quando separamos os pacientes com e sem RI, não se encontrou diferença estatística (p ≥ 0.05

O grupo de pacientes com lesões (AC) foi separado em grupo de pacientes com RI (HOMA >2,5)[47] e sem RI (controle), mas não foi encontrado diferença na imunomarcação do IGF entre os dois grupos p= 0,977 (Figura 18).

A marcação do GIP foi, facilmente, detectada nos acrocórdones. Quando comparado com a pele controle dos mesmos indivíduos e quando comparada as peles de indivíduos sem AC. A % de área positiva para GIP na epiderme (queratinócitos) das lesões de acrocórdones foi significativamente maior que na epiderme dos controles (pele normal), com p = 0.034 (Figura 19 e 20).

O grupo de pacientes com lesões (AC) foi separado em grupo de pacientes com RI (HOMA >2,5)[47] e sem RI. Houve diferença na imunomarcação do GIP entre os dois grupos com p= 0,046. O grupo com RI apresentou % de área positiva menor em relação ao grupo sem RI (controle) (Figura 21).

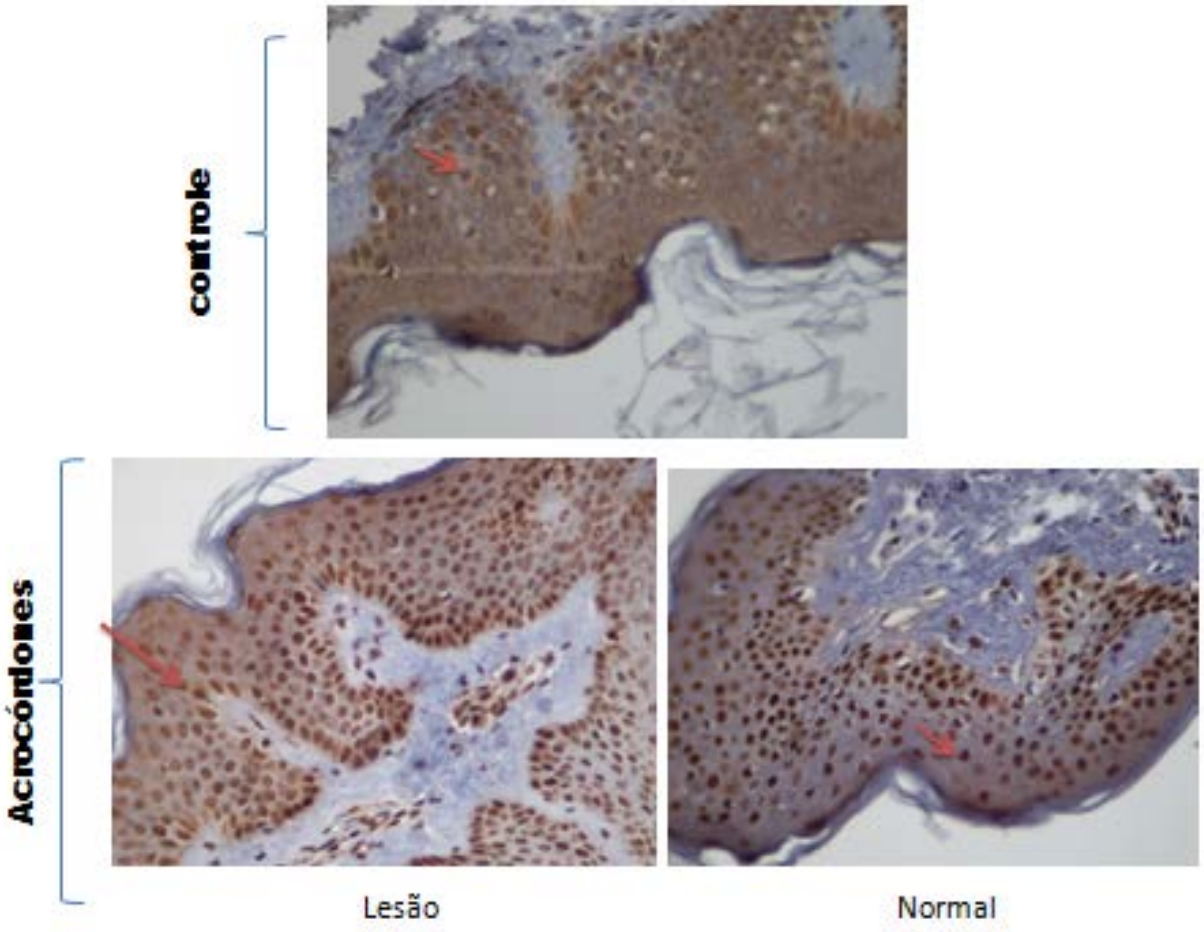


Figura 16: Pele imunomarcada pelo IGF-1 nos 3 grupos: grupo controle (pele remanescente de cirurgia pástica), pele de lesão e pele aparentemente normal de indivíduo com AC. A pigmentação acastanhada demonstra a imunomarcação com IGF (marcado pela seta) no núcleo dos queratinócitos.

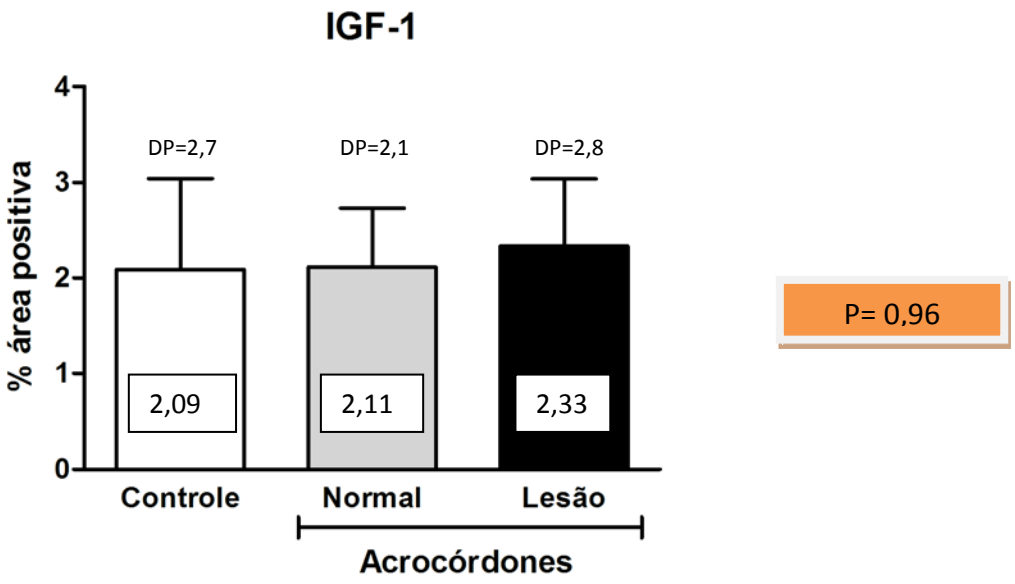


Figura 17: Gráfico da diferença entre as porcentagens (%) de áreas positivas para proteína IGF-1 nas lesões de acrocórdones, pele normal dos indivíduos com AC e nos indivíduos normais (grupo controle).

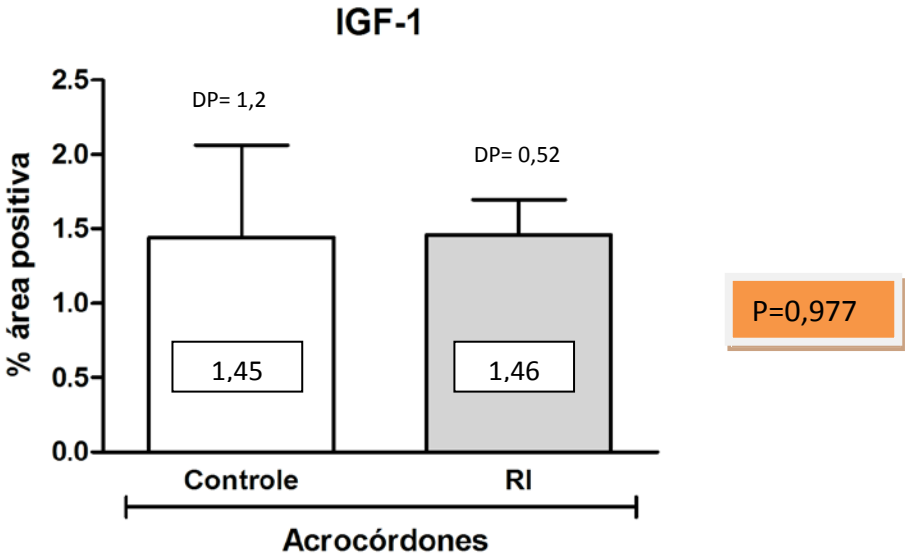


Figura 18: Comparação da imunomarcação com IGF dos pacientes com AC sem e com resistência à insulina.

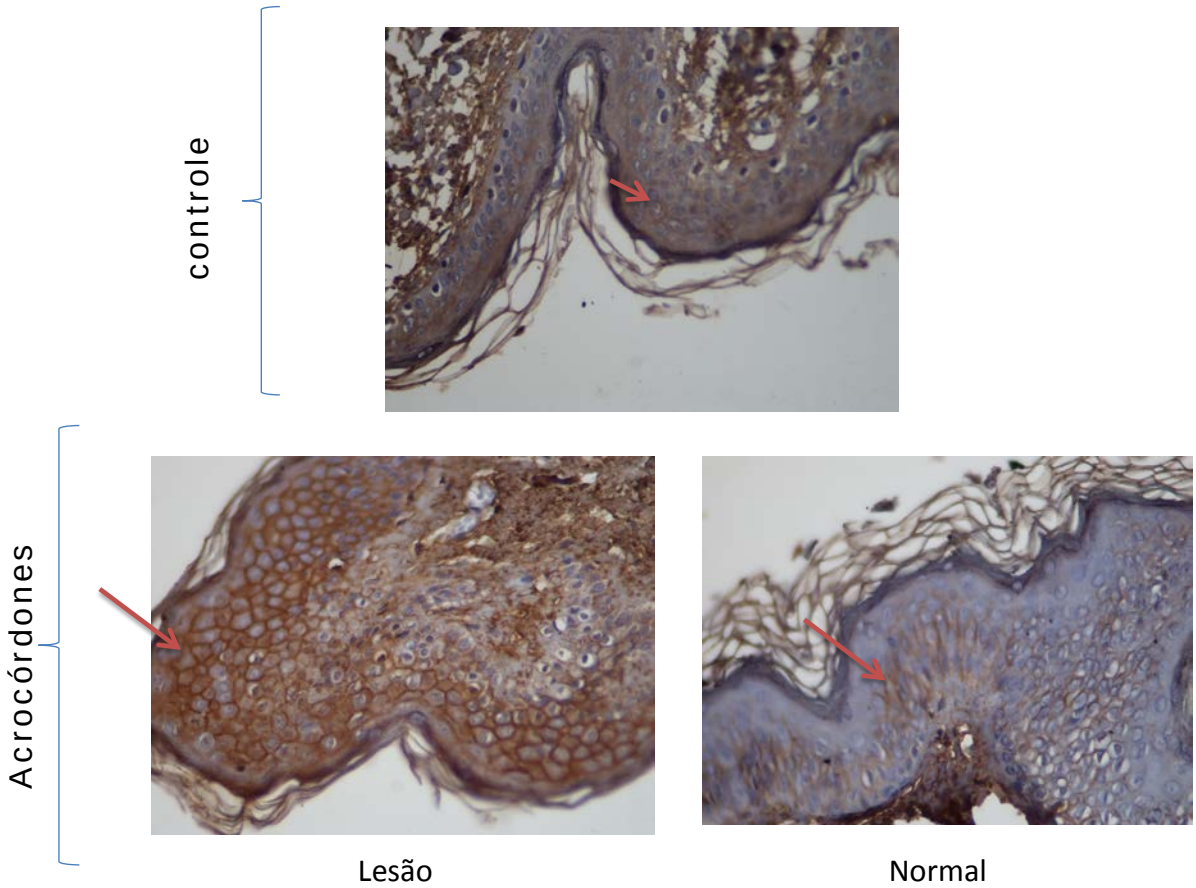


Figura 19: Pele imunomarcada pelo GIP nos 3 grupos: grupo controle (pele remanescente de cirurgia pástica), pele de lesão e pele normal de indivíduo com AC. A pigmentação acastanhada demonstra a imunomarcação com GIP (marcado pela seta) em torno queratinócitos, que é facilmente verificada na foto de microscopia da pele da lesão.

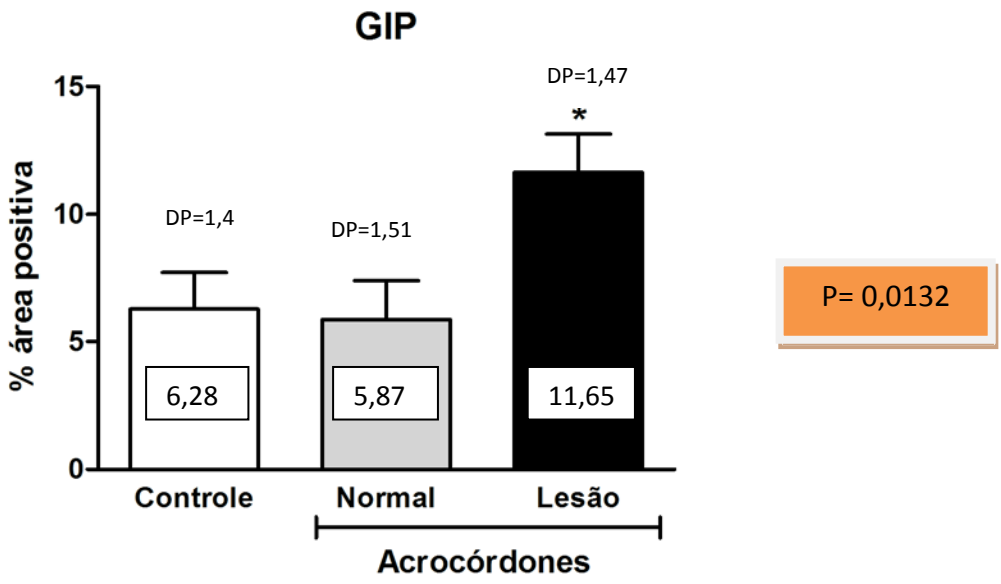


Figura 20: Gráfico da diferença entre as porcentagens (%) de áreas positivas para marcação do GIP nas lesões de acrocórdones, pele normal dos indivíduos com AC e nos indivíduos normais (grupo controle).

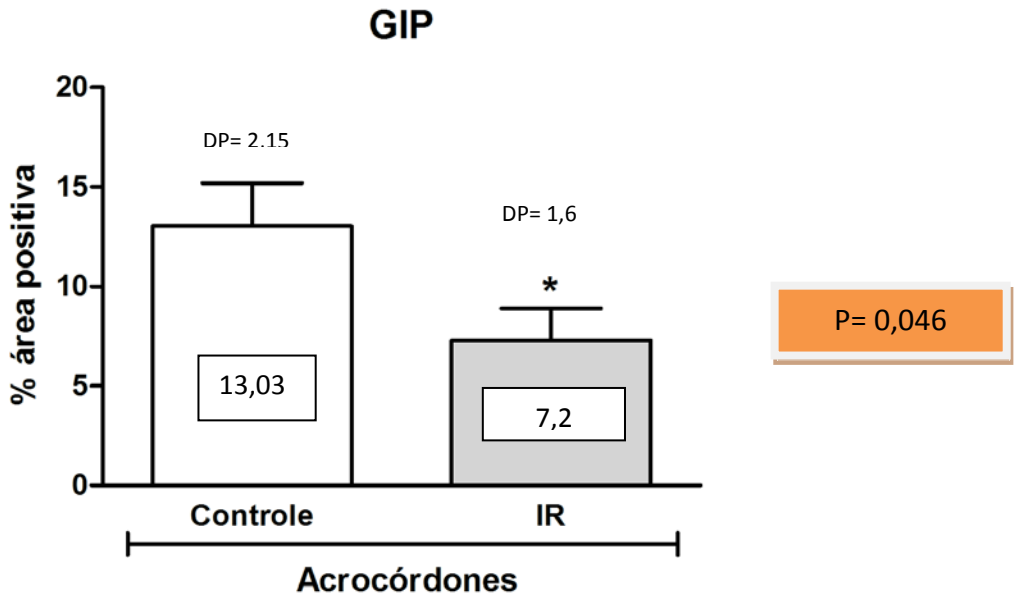


Figura 21: Comparação da imunomarcação com GIP dos pacientes com AC sem e com resistência à insulina.

6. DISCUSSÃO

A frequência de AC, acima dos 40 anos é de 37%, enquanto na população geral a frequência está entre 20 e 25%[51, 52]. Entretanto, Banik[52] coloca que apesar de 46% da população geral possuir AC, apenas 14,4% apresentam oito ou mais lesões no corpo. A Sociedade brasileira de dermatologia, em pesquisa realizada em 2006, estimou que 0,9% a 1,2% das consultas dermatológicas no Brasil foram motivadas pela presença de AC[53]. Jowkar e colaboradores[11], em seus estudos, encontraram uma prevalência maior de AC nas mulheres, porém Kahana e Thappa[54] observaram nas suas pesquisas que a prevalência entre homens e mulheres é a mesma.

No presente estudo, a prevalência de AC foi muito maior em mulheres (73%). Esse fato pode ser justificado, pois as mulheres possuem maior preocupação com a aparência, e a maioria dos pacientes que procuram o dermatologista por esses motivos, procura resolver um problema estético, quando na verdade, os AC já deveriam ser encarados, em alguns casos, como uma lesão cutânea preditora de resistência à insulina [123].

A redução da ação da insulina nos tecidos alvos pode vir acompanhada de uma série de alterações metabólicas como hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL, doença cardiovascular aterosclerótica, entre outras[123]. O conjunto dessas alterações compreendem a síndrome X ou síndrome metabólica[6, 7, 8].

O diagnóstico de resistência à insulina é de suma importância, já que segundo o estudo UKPDS (United Kingdon Prospective Diabetes Study) demonstra que quando é feito o diagnóstico, o diabético já perdeu 50% da massa de células

beta e que a disfunção dessas células teve início, provavelmente, 10 a 12 anos antes [124].

Além disso, estes pacientes podem apresentar já no momento do diagnóstico complicações variadas. A neuropatia e a nefropatia são as complicações crônicas mais comuns do Diabetes Mellitus. Em estudo indiano recente, de 100 casos de DM recém diagnosticados, 21% dos pacientes apresentavam proteinúria e 31% neuropatia. Se somadas as duas complicações estiveram presentes em 16% dos pacientes [125].

Em outro estudo, com pacientes americanos diabéticos tipo 2 recém diagnosticados com 40 anos ou mais, 24,9% possuíam nefropatia e 21,5% neuropatia periférica, demonstrando o quanto a população deve ser alvo de medidas preventivas de saúde e educacionais [126].

Tamega e colaboradores[8] identificaram uma associação independente entre a presença de mais de cinco AC e elevação de 1,4 unidades no índice HOMA-IR. Senel e colaboradores[2] encontraram 50,9% de diabéticos em 110 pacientes com acrocórdones. Além disso, este mesmo grupo detectou aumento das enzimas hepáticas, aumento no colesterol (colesterol total, LDL e triglicerídeos) e diminuição no HDL nos pacientes com lesões cutâneas.

No presente estudo, estudamos 57 pacientes com AC, sem história prévia de DM, e encontramos níveis de glicemia de jejum, insulina de jejum, triglicerídeos e GGT maiores que nos controles ($p<0.05$). O índice HOMA-IR dos pacientes com AC também foi maior que no grupo controle, com elevação de 2,28 unidades no grupo com AC, $p = 0.002$. Portanto, os AC podem servir como importante marcador de RI, como já aventado previamente.

A obesidade associa-se a RI, a RI parece ser consequência da adiposidade central e este é um evento chave da síndrome metabólica. Na população geral, o risco relativo de diabetes em pessoas obesas em comparação com indivíduos com IMC normal é 7,19 e quando comparados com indivíduos com sobrepeso é 2,99[117].

Quando utilizamos os pontos de corte do índice HOMA baseado no IMC, proposto por Ghiringhello e colaboradores[45] num estudo realizado com 1898 brasileiros com glicemia menor que 99mg/dl, encontramos diferença no HOMA dos pacientes com AC, sendo maior nos pacientes com lesões cutâneas nos subgrupos com IMC<25 kg/m^2 e no subgrupo com IMC de 25 a 30 kg/m^2 , com p<0.001 (Tabela 5, Figura 22).

Tabela 5: Comparação entre os valores do HOMA para o grupo com lesões (AC) e para a população brasileira, segundo categorias do Índice de Massa Corporal (IMC).

	Grupo Lesões		População Brasileira		
IMC	Média	DP	Média	DP	p
< 25	2.39	1.90	1.20	0.65	<0.001
25-30	2.59	3.22	1.80	0.98	<0.001
> 30	5.16	4.50	2.90	1.60	0.140

Os valores da população brasileira foram extraídos do estudo de Ghringhello MT e colaboradores[45]

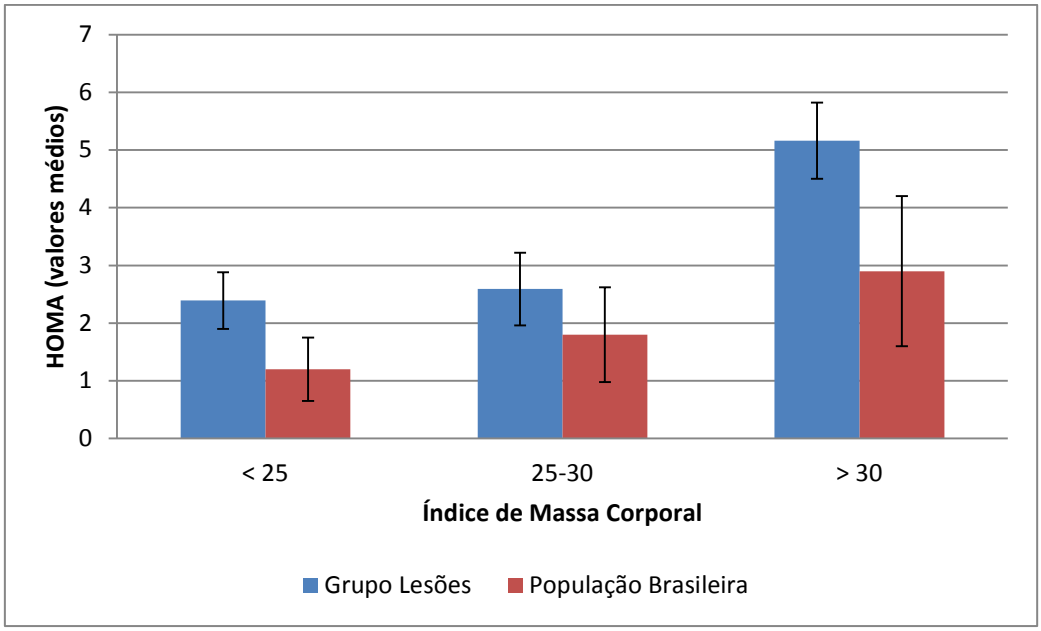


Figura 22: Gráfico da comparação do HOMA para o grupo com lesões (AC) e para a população brasileira, segundo categorias do Índice de Massa Corporal (IMC).

Quando estratificamos o grupo de pacientes com lesões em obesos e não obesos, segundo o IMC, verificamos uma maior glicemia de jejum no grupo de obesos quando comparamos com a média do grupo de não obesos (sobrepeso e normais), p=0,021, demonstrando, portanto, a importância da obesidade como fator de risco para RI. O índice HOMA foi maior nos obesos p=0,031, porém quando analisado separadamente, o grupo de pacientes não obesos também apresenta índice HOMA elevado[2, 124], demonstrando que a presença de AC por si só, já é um marcador de RI, como relatado por Copeland e colaboradores[79] em 2005.

Assim como nas lesões de AC, Sadeghian[46] em 2009 investigou RI em mulheres obesas com acantose nigricante (AN) e identificou que as lesões cutâneas demostraram ser um marcador de RI. Wiegan e colaboradores em 2004[80], estudando crianças obesas, também concluíram que aquelas que apresentavam AN é que estavam mais propensas a elevação do HOMA-IR.

O que explica a associação dessas lesões com a RI são a participação da insulina no estímulo de fatores de crescimento levando a hiperproliferação de queratinócitos [127].

O excesso de IGF-1 em resposta à hiperinsulinemia, estimula a proliferação de queratinócitos e fibroblastos[127]. Nanney e colaboradores[12] observaram que o crescimento do AC se correlacionam com o aumento do EGF na epiderme. O EGF depende do IGF-1 para estimular a proliferação celular. O receptor de IGF-1 localiza-se na camada basal da epiderme, portanto, sugere-se que o IGF-1 e EGF, participem da regulação do crescimento epidérmico e na patogênese de doenças cutâneas hiperproliferativas.

Jowkar, Fallahi e Namazi[11] em 2008 tentaram dosar os níveis de IGF-1 séricos, utilizando radioimunoensaio, em 40 pacientes com AC, sem história de diabetes e comparam com 40 pacientes normais. A insulina sérica dos pacientes com AC foi significantemente maior que nos controles (p=0,00), mas os níveis de IGF não foram diferentes entre os grupos (p=0,43).

No nosso estudo, quantificamos a imunomarcação de IGF-1 (% de área marcada) na pele de AC, comparamos com a pele de área não acometida (pele normal) de pacientes com lesões e com a pele remanescente de cirurgia plástica (pele controle). Não encontramos diferença estatística na % de área imunomarcada pelo IGF-1 entre os grupos (p = 0,964). Este achado pode indicar que apesar do IGF participar da fisiopatologia dos AC, o número de receptores e a expressão de IGF pode ser normal e apenas a ação do IGF no receptor estar alterada (hiperativa).

Bosseila e Shaker[128] comparando pele normal de pacientes sem lesões e pele de AC (20 pacientes), demonstraram por ELISA um aumento do IGF em

pacientes com AC, porem esse aumento da expressão em comparação ao grupo controle diminuiu quando os pacientes com AC foram subdivididos em pacientes com RI, DM e AN. Isso pode ser uma das explicações de porque no nosso estudo a expressão de IGF pode ter sido baixa, já que grande parte de nossa amostra e representada por pacientes que além de AC apresentam RI e AN.

Quando separamos os pacientes com AC em grupos que possuem RI e que não possuem RI, não observamos diferença na imunomarcação do IGF-1 entre os grupos ($p>0.05$).

E interessante ressaltar que em outro estudo, Blakythy e colaboradores[129], atribuíram a lenta cicatrização de feridas em pacientes diabéticos a diminuição de IGF nesses pacientes.

O GIP quando quantificado na pele, foi nitidamente marcado na epiderme dos AC (coloração acastanhada na membrana dos queratinócitos), quando comparamos com o grupo de pele normal dos pacientes com lesões e quando comparado ao grupo controle (pele de cirurgia plástica) ($p = 0.013$). O GIP já havia sido quantificado em uma série de tecidos (ossos, cérebro, tecido adiposo e sangue), porém não encontramos nas bases de dados estudadas (Medline/ PubMed/ Lilacs e Cochrane) nenhum estudo da imunomarcação do GIP na epiderme.

O GIP, assim como o GLP-1 (peptídeo do tipo glucagon), são incretinas e seu papel fisiológico parece ser o de agente insulinotrópico com um efeito estimulante sobre a liberação e síntese de insulina. Os efeitos do GIP sobre a liberação de insulina não ocorrem se os níveis plasmáticos de glicose estiverem normais. Para o GIP mediar a secreção de insulina é necessário o aumento dos

níveis de glicose (ingestão de carboidratos)[105]. Além de ser insulinotrópico, o GIP está envolvido no metabolismo da gordura em adipócitos: aumenta a insulina estimulando a incorporação de ácidos graxos em triglicerídeos[106], e promove a proliferação celular[107, 108]. Concentrações de GIP têm se mostrado elevados em pessoas obesas[105, 109, 110].

Calanna e colaboradores[117], num estudo publicado em 2012, demonstraram que indivíduos com sindrome metabólica e tolerantes a glicose (teste de tolerância à glicose normal) apresentaram aumento da secreção do GIP o que sugere o papel das incretinas na manutenção da homeostase da glicose nos pacientes com síndrome X.

O aumento do GIP também ja foi relatado em pacientes com DM tipo 2 e pacientes intolerantes a glicose (RI). Nesses pacientes, o aumento do GIP foi descrito como uma tentativa desses indivíduos compensarem o efeito insulinotrópico reduzido do GIP[117]. Este efeito insulinotrópico reduzido deve-se a redução da massa de celulas beta nessas patologias. Nesses estudos o GIP foi sempre dosado no sangue dos pacientes [117,118].

Assim como no nosso estudo, no câncer coloretal o GIP mostrou-se aumentado, contribuindo para proliferação celular e para carcinogênese. Comprovando, portanto, seu papel na proliferação celular[130].

Uma hipótese para o aumento da imunomarcação de GIP na epiderme seria que a expressao de GIP pelos queratinócitos, e talvez por células da derme, na tentativa de facilitar o influxo de insulina na pele (hormônio insulinotrópico). Esse mecanismo acaba resultando em proliferação dos queratinócitos (hiperplasia epitelial) o que corrobora com os achados de estudos como o de Prabakaram e

colaboradores[130] em 2010, que demonstra hiperproliferação estimulada pelo GIP em células do intestino. Isso demonstra o efeito pleiotrófico e mitogênico do GIP nos tecidos alvo.

Porém, quando separamos os pacientes com AC em grupos de indivíduos com e sem RI, observamos uma diminuição da imunomarcação do GIP em pacientes com RI (p=0.04). Uma hipótese para os achados do presente estudo seria que nos indivíduos com AC o aumento da expressão do GIP na epiderme poderia contribuir para aumentar o influxo de insulina (ação insulinotrópica), contribuindo para proliferação celular e fisiopatologia das lesões, porém com a evolução da RI, o indivíduo diminui a expressão da incretina GIP (como um fenômeno de *feedback*) na epiderme por algumas hipóteses já aventadas em estudo anterior [118]: defeito na expressão dos receptores de GIP, diminuição na sinalização do GIP ou diminuição das células beta pancreáticas.

Tendo em vista, que os AC, devem ser encarados como sinais de RI e que esta é uma doença multisistêmica e com alto índice de mortalidade e adicionando a diminuição da imunomarcação do GIP nas lesões cutâneas; julga-se necessário pesquisas futuras para confirmação dos achados, pois, assim, a conduta frente a essas lesões cutâneas poderia ser iniciar prontamente o tratamento sistêmico para esses pacientes, em detrimento ao tratamento apenas estético dessas lesões.

Com o grande número de medicações disponíveis no mercado para o tratamento de DM, entre estas as terapias baseadas nas incretinas[131], a imunomarcação do GIP na pele de AC, poderia colaborar para a escolha de quais os pacientes que se beneficiariam de determinadas medicações para tratamento da RI e prevenção do DM.

7. CONCLUSÕES

a. A imunomarcação do GIP na epiderme foi expressamente maior nos acrocórdons do que na pele normal de pacientes com lesões e na pele remanescente de cirurgia plástica (grupo controle). A imunomarcação do IGF-1 nas lesões de AC, na pele sã (sem lesões) dos mesmos pacientes, bem como na pele de pacientes sem AC não foi diferente entre os grupos por meio de análise imuno-histoquímica.

b. O HOMA-IR (Modelo de homeostase de resistência à insulina) médio dos pacientes com lesões (AC) foi maior do que o HOMA médio dos pacientes do grupo controle ($p < 0.05$). Quando os pacientes com AC foram estratificados em obesos e não obesos, o HOMA-IR foi maior nos obesos quando comparado aos indivíduos sobrepeso e eutróficos ($p<0,05$). Porém o indice HOMA no grupo de não obesos também estava aumentado, demonstrando que a presença de AC pode ser um sinal independente para o aparecimento de resistência à insulina;

c. A imunomarcação pelo IGF-1 nos indivíduos com AC não diferiu entre os grupos com e sem RI, já a imunomarcação pelo GIP, em pacientes com AC, foi menor nos pacientes com RI ($p<0.05$).

NOTA: Este foi o primeiro estudo publicado na literatura indexada demonstrando a expressão da incretina GIP na pele humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sudy E, Urbina F, Maliqueo M, Sir T. Screening of glucose/insulin metabolic alterations in men with multiple skin tags on the neck. J Dtsch Dermatol Ges. 2008; 6:852-6.

2. Senel E, Salmanoglu M, Solmazgul E, Bercik Inal B. Acrochordons as a cutaneous sign of impaired carbohydrate metabolism, hyperlipidemia, liver enzyme abnormalities and hypertension: a case-control study. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04396.x

3. Boza J C, Trindade E N, Peruzzo J, Sachett L, Rech L, Cestari T F. Skin manifestations of obesity: a comparative study. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012; 10:1220-3.

4. Touraine A. A new hereditary chain; cutaneous fibromas, diabetes, obesity. Ann Dermatol Syphiligr. 1951; 78: 409-16.

5. Valdes Rodriguez R, Moncada Gonzalez B, Rivera Rodriguez S P, Aradillas Garcia C, Hernandez-Rodriguez H, Torres Alvarez B. Acrocordones y Acantosis nigricans: correlacion con resistencia a la insulina y sobrepeso en ninos mexicanos. Piel y resistencia a la insulina en ninos. Gac Med Mex. 2011; 147: 297-302.

6. Reaven G M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes. 1988; 37:1595-607.

7. Geloneze B, Tambascia M A. Avaliação laboratorial e diagnóstico de resistência insulínica. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006; 50: 208-15.

8. Tamega Ade A, Aranha A M, Guiotoku M M, Miot L D, Miot H A. Associacão entre acrocórdons e resistência à insulina. An Bras Dermatol. 2010; 85:25-31.

9. Dwivedi S, Jhamb R. Cutaneous markers of coronary artery disease. World J Cardiol. 2010; 2: 262-9.

10. Rasi A, Soltani-Arabshahi R, Shahbazi N. Skin tag as a cutaneous marker for impaired carbohydrate metabolism: a case-control study. Int J Dermatol. 2007; 46: 1155-9.

11. Jowkar F, Fallahi A, Namazi M R. Is there any relation between serum insulin and insulin-like growth factor-I in non-diabetic patients with skin tag? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009; 24: 73-4.

12. Nanney L B, Ellis D L, Levine J, King L E. Epidermal growth factor receptors in idiopathic and virally induced skin diseases. Am J Pathol. 1992; 140: 915-25.

13. Mathur S K, Bhargava P. Insulin resistance and skin tags. Dermatology. 1997; 195: 184.

14. Creutzfeldt W. The [pre-] history of the incretin concept. Regul Pept. 2005; 128: 87-91.

15. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterol. 2007; 132: 2131–57.

16. Maitra S K, Rowland Payne C M. The obesity syndrome and acanthosis nigricans. Acanthosis nigricans is a common cosmetic problem providing epidemiological clues to the obesity syndrome, the insulin-resistance syndrome, the thrifty metabolism, dyslipidaemia, hypertension and diabetes mellitus type II. J Cosmet Dermatol. 2004; 3: 202-10.

17. Guran T, Turan S, Akcay T, Bereket A. Significance of acanthosis nigricans in childhood obesity. J Paediatr Child Health. 2008; 44: 338-41.

18. Organização Mundial da Saúde. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. *WHO Obesity Technical Report Series* 894**:** World Health Organization Geneva, Suiça. 2000.

19. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. J Am Acad Dermatol. 2007; 56: 901-16; quiz 917-20.

20. Boza J, Rech L, Sachett L, Menegon D, Cestari T. Manifestações dermatológicas da obesidade. Revista HCPA. 2010; 30, 55-62.

21. Flegal K M, Carroll M D, Ogden C L, Curtin L R. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. Jama. 2010; 303: 235-41.

22. Lenz M, Richter T, Muhlhauser I. The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review. Dtsch Arztebl Int. 2009; 106: 641-8.

23. Al-Mutairi N. Associated cutaneous diseases in obese adult patients: a prospective study from a skin referral care center. Med Princ Pract. 2011; 20: 248-52.

24. Kiess W, Galler A, Reich A, Muller G, Kapellen T, Deutscher J, Raile K, Kratzsch J. Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence. Obes Rev. 2001; 2: 29-36.

25. Pergher R N, Melo M E, Halpern A, Mancini M C. Is a diagnosis of metabolic syndrome applicable to children? J Pediatr (Rio J). 2010; 86: 101-8.

26. Steinberrg J. Diagnosis of the metabolic sindrome in children. Curr Opin Lipidol. 2003; 14: 555-9.

27. Vasques A C, Rosado L E, Cassia G R, Geloneze B. Análise Crítica do Uso dos Índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na Avaliação da Resistência à Insulina e Capacidade Funcional das Células ^{2}-Pancreáticas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008; 52: 32-9.

28. Yki-Jarvinen H, Koivisto V A. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. N Engl J Med. 1986; 315: 224-30.

29. Kissebah A H. Insulin resistance in visceral obesity. Int J Obes. 1991; 15 Suppl 2: 109-15.

30. Hermanns-Le T, Scheen A, Pierard G E. Acanthosis nigricans associated with insulin resistance : pathophysiology and management. Am J Clin Dermatol. 2004; 5: 199-203.

31. Cordain L, Eades M R, Eades M D. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2003; 136: 95-112.

32. Greenberg A S, McDaniel M L. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. Eur J Clin Invest. 2002; 32 (Suppl 3): 24-34.

33. Beck-Nielsen H. [Insulin resistance: organ manifestations and cellular mechanisms]. Ugeskr Laeger. 2002; 164: 2130-5.

34. Yarak S B, E; Filho,ST. Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. An Bras Dermatol. 2005; 80: 395-410.

35. Dunaif A, Xia J, Book C B, Schenker E, Tang Z. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. J Clin Invest. 1995; 96: 801-10.

36. Higgins S P, Freemark M, Prose N S. Acanthosis nigricans: a practical approach to evaluation and management. Dermatol Online J. 2008; 14: 2.

37. Attia N, Tamborlane W V, Heptulla R, Maggs D, Grozman A, Sherwin R S, Caprio S. The metabolic syndrome and insulin-like growth factor I regulation in adolescent obesity. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83: 1467-71.

38. Ferry R J, Jr., Cerri R W, Cohen P. Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. Horm Res. 1999; 51: 53-67.

39. Kidson W. Polycystic ovary syndrome: a new direction in treatment. Med J Aust. 1998; 169: 537-40.

40. Goodarzi M O, Erickson S, Port S C, Jennrich R I, Korenman S G. beta-Cell function: a key pathological determinant in polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90: 310-5.

41. Abdel Fattah N S, Darwish Y W. Is there a role for insulin resistance in nonobese patients with idiopathic hirsutism? Br J Dermatol. 2009; 160: 1011-5.

42. Rudman S M, Philpott M P, Thomas G A, Kealey T. The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? J Invest Dermatol. 1997; 109: 770-7.

43. Bol D K, Kiguchi K, Gimenez-Conti I, Rupp T, DiGiovanni J. Overexpression of insulin-like growth factor-1 induces hyperplasia, dermal abnormalities, and spontaneous tumor formation in transgenic mice. Oncogene. 1997; 14: 1725-34.

44. Geloneze B, Vasques A C, Stabe C F, Pareja J C, Rosado L E, Queiroz E C, Tambascia M A. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009; 53: 281-7.

45. Ghiringhello MT, Vieira JG, Tachibana TT, Ferrer C, Maciel RMB, Oliveira CHRM. Distribution of HOMA-IR in brazilian subjects wuth different body mass indexes. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50:573-4.

46. Sadeghian G, Ziaie H, Amini M, Ali Nilfroushzadeh M. Evaluation of insulin resistance in obese women with and without acanthosis nigricans. J Dermatol. 2009; 36: 209-12.

47. Rezzonico J, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomniszcze H. High prevalence of thyroid nodules in patients with achrocordons (skin tags). Possible role of insulin-resistance. Medicina (B Aires). 2009; 69: 302-4.

48. Demir S, Demir Y. Acrochordon and impaired carbohydrate metabolism. Acta Diabetol. 2002; 39: 57-9.

49. Pariser R J. Benign neoplasms of the skin. Med Clin North Am. 1998; 82: 1285-307.

50. McKee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the skin with clinical correlations. 3 Ed. Elsevier, 2005.

51. Turner R C, Holman R R, Matthews D, Hockaday T D, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. Metabolism. 1979; 28: 1086-96.

52. Banik R, Lubach D. Skin tags: localization and frequencies according to sex and age. Dermatologica. 1987; 174: 180-3.

53. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Perfil nosologico das consultas dermatológicas no Brasil. Ann Bras Dermatol. 2006; 81: 549-58.

54. Kahana M, Grossman E, Feinstein A, Ronnen M, Cohen M, Millet M S. Skin tags: a cutaneous marker for diabetes mellitus. Acta Derm Venereol. 1987; 67: 175-7.

55. Thappa D M. Skin tags as markers of diabetes mellitus: an epidemiological study in India. J Dermatol. 1995; 22: 729-31.

56. Norris P G, McFadden J, Gale E, Griffiths W A. Skin tags are more closely related to fasting insulin than fasting glucose levels. Acta Derm Venereol. 1988; 68: 367-8.

57. Crook M A. Skin tags and the atherogenic lipid profile. J Clin Pathol. 2000; 53: 873-4.

58. Erdogan B S, Aktan S, Rota S, Ergin S, Evliyaoglu D. Skin tags and atherosclerotic risk factors. J Dermatol. 2005; 32: 371-5.

59. Sari R, Akman A, Alpsoy E, Balci M K. The metabolic profile in patients with skin tags. Clin Exp Med. 2010; 10: 193-7.

60. Shaheen M A, Abdel Fattah N S, Sayed Y A, Saad A A. Assessment of serum leptin, insulin resistance and metabolic syndrome in patients with skin tags. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011; doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04401.x.

61. El Safoury O, Rashid L, Ibrahim M. A study of androgen and estrogen receptors alpha, beta in skin tags. Indian J Dermatol. 2010; 55: 20-4.

62. Allegue F, Fachal C, Perez-Perez L. Friction induced skin tags. Dermatol Online J. 2008; 14: 18.

63. Yilmaz E, Kelekci K H, Kelekci S. Skin tag and acanthosis nigricans: do they have a predictive value for gestational diabetes mellitus? Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2011; 119: 419-22.

64. Cohen P G. The hypogonadal-obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone-estradiol shunt--a major factor in the genesis of morbid obesity. Med Hypotheses. 1999; 52: 49-51.

65. Dianzani C, Calvieri S, Pierangeli A, Imperi M, Bucci M, Degener A M. The detection of human papillomavirus DNA in skin tags. Br J Dermatol. 1998; 138: 649-51.

66. Gupta S, Aggarwal R, Gupta S, Arora S K. Human papillomavirus and skin tags: is there any association? Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2008; 74: 222-5.

67. Lobb R R. Clinical applications of heparin-binding growth factors. Eur J Clin Invest. 1988; 18: 321-36.

68. Schwartz R A. Acanthosis nigricans. J Am Acad Dermatol. 1994; 31: 1-19; quiz 20-2.

69. Krane J F, Murphy D P, Carter D M, Krueger J G. Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I) on keratinocyte proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation of the EGF receptor. J Invest Dermatol. 1991; 96: 419-24.

70. Stuart C A, Pate C J, Peters E J. Prevalence of acanthosis nigricans in an unselected population. Am J Med. 1989; 87: 269-72.

71. Stuart C A, Smith M M, Gilkison C R, Shaheb S, Stahn R M. Acanthosis Nigricans among Native Americans: an indicator of high diabetes risk. Am J Public Health. 1994; 84: 1839-42.

72. Hud J A, Jr., Cohen J B, Wagner J M, Cruz P D, Jr. Prevalence and significance of acanthosis nigricans in an adult obese population. Arch Dermatol. 1992; 128: 941-4.

73. Lopez-Alvarenga J C, Garcia-Hidalgo L, Landa-Anell M V, Santos-Gomez R, Gonzalez-Barranco J, Comuzzie A. Influence of skin color on the diagnostic utility of clinical acanthosis nigricans to predict insulin resistance in obese patients. Arch Med Res. 2006; 37: 744-8.

74. Stoddart M L, Blevins K S, Lee E T, Wang W, Blackett P R. Association of acanthosis nigricans with hyperinsulinemia compared with other selected risk factors

for type 2 diabetes in Cherokee Indians: the Cherokee Diabetes Study. Diabetes Care. 2002; 25: 1009-14.

75. Kong A S, Williams R L, Smith M, Sussman A L, Skipper B, Hsi A C, Rhyne R L. Acanthosis nigricans and diabetes risk factors: prevalence in young persons seen in southwestern US primary care practices. Ann Fam Med. 2007; 5: 202-8.

76. Munoz-Perez M A, Camacho F. Acanthosis nigricans: a new cutaneous sign in severe atopic dermatitis and Down syndrome. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2001; 15: 325-7.

77. Yamazaki H, Ito S, Yoshida H. Acanthosis nigricans is a reliable cutaneous marker of insulin resistance in obese Japanese children. Pediatr Int. 2003; 45: 701-5.

78. Burke J P, Hale D E, Hazuda H P, Stern M P. A quantitative scale of acanthosis nigricans. Diabetes Care. 1999; 22: 1655-9.

79. Copeland K, Pankratz K, Cathey V, Immohotichey P, Maddox J, Felton B, McIntosh R, Parker D, Burgin C, Blackett P. Acanthosis Nigricans, insulin resistance (HOMA) and dyslipidemia among Native American children. J Okla State Med Assoc. 2006; 99: 19-24.

80. Wiegand S, Maikowski U, Blankenstein O, Biebermann H, Tarnow P, Gruters A. Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in European children and adolescents with obesity - a problem that is no longer restricted to minority groups. Eur J Endocrinol. 2004; 151: 199-206.

81. Araujo L M, Porto M V, Netto E M, Ursich M J. Association of acanthosis nigricans with race and metabolic disturbances in obese women. Braz J Med Biol Res. 2002; 35: 59-64.

82. Charnvises K, Weerakiet S, Tingthanatikul Y, Wansumrith S, Chanprasertyothin S, Rojanasakul A. Acanthosis nigricans: clinical predictor of abnormal glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol. 2005; 21: 161-4.

83. Hirschler V, Aranda C, Oneto A, Gonzalez C, Jadzinsky M. Is acanthosis nigricans a marker of insulin resistance in obese children? Diabetes Care. 2002; 25: 2353.

84. Caceres M, Teran C G, Rodriguez S, Medina M. Prevalence of insulin resistance and its association with metabolic syndrome criteria among Bolivian children and adolescents with obesity. BMC Pediatr. 2008; 8: 31.

85. Scott A T, Metzig A M, Hames R K, Schwarzenberg S J, Dengel D R, Biltz G R, Kelly A S. Acanthosis nigricans and oral glucose tolerance in obese children. Clin Pediatr (Phila). 2010; 49: 69-71.

86. Hardin D S. Screening for type 2 diabetes in children with acanthosis nigricans. Diabetes Educ. 2006; 32: 547-52.

87. Baker J, Olsen L, Sorensen T. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. N Engl J Med. 2007; 357: 2329-36. .

88. Miura N, Ikezaki A, Iwama S, Matsuoka H, Ito K, Sugihara S. Genetic factors and clinical significance of acanthosis nigricans in obese Japanese children and adolescents. Acta Paediatr. 2006; 95: 170-5.

89. YIkezaki A, Miura N, Kikuoka N, Kim H, Matsuoka H, Ito K. Clinical characteristics of obese Japanese children with acanthosis nigricans. Clin Pediatr Endocrinol. 2001; 10: 47-52.

90. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler W C, Celi F S, Austin S, Manning B, Strosberg A D, Stern M P, Raben N, et al. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. N Engl J Med. 1995; 333: 343-7.

91. Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L, Arner P. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. J Clin Invest. 1997; 100: 3005-13.

92. DeFronzo R A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med. 1999; 131: 281-303.

93. Roemmich J N, Clark P A, Lusk M, Friel A, Weltman A, Epstein L H, Rogol A D. Pubertal alterations in growth and body composition. VI. Pubertal insulin resistance: relation to adiposity, body fat distribution and hormone release. Int J Obes Relat Metab Disord. 2002; 26: 701-9.

94. University of Texas. [Internet]. Texas Risk Assessment Advisory for type 2 Diabetes in Children. [cited 2010 jan 10]. Disponível em: https://rfes.utpa.edu/

95. Ellis D L, Nanney L B, King L E, Jr. Increased epidermal growth factor receptors in seborrheic keratoses and acrochordons of patients with the dysplastic nevus syndrome. J Am Acad Dermatol. 1990; 23: 1070-7.

96. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. Endocr Rev. 1987; 8: 95-114.

97. Hebda P A. Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures. J Invest Dermatol. 1988; 91: 440-5.

98. Shipley G D, Keeble W W, Hendrickson J E, Coffey R J, Jr., Pittelkow M R. Growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in serum-free medium is stimulated by acidic and basic fibroblast growth factor. J Cell Physiol. 1989; 138: 511-8.

99. O'Keefe E J, Chiu M L, Payne R E, Jr. Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor. J Invest Dermatol. 1988; 90: 767-9.

100. Schoenle E, Zapf J, Humbel R E, Froesch E R. Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. Nature. 1982; 296: 252-3.

101. Conover C A, Rosenfeld R G, Hintz R L. Hormonal control of the replication of human fetal fibroblasts: role of somatomedin C/insulin-like growth factor I. J Cell Physiol. 1986; 128: 47-54.

102. Ristow H J, Messmer T O. Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes. J Cell Physiol. 1988; 137: 277-84.

103. Brown J C, Dryburgh J R, Ross S A, Dupre J. Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. Recent Prog Horm Res. 1975; 31: 487-532.

104. Dupre J, Ross S A, Watson D, Brown J C. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. J Clin Endocrinol Metab. 1973; 37: 826-8.

105. Ross S A, Dupre J. Effects of ingestion of triglyceride or galactose on secretion of gastric inhibitory polypeptide and on responses to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. Diabetes. 1978; 27: 327-33.

106. Yip R G, Wolfe M M. GIP biology and fat metabolism. Life Sci. 2000; 66: 91-10

107. Trumper A, Trumper K, Horsch D. Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INS-1)-cells. J Endocrinol. 2002; 174: 233-46.

108. Trumper A, Trumper K, Trusheim H, Arnold R, Goke B, Horsch D. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. Mol Endocrinol. 2001; 15: 1559-70.

109. Creutzfeldt W, Ebert R, Willms B, Frerichs H, Brown J C. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in obesity: increased response to stimulation and defective feedback control of serum levels. Diabetologia. 1978; 14: 15-24.

110. Flatt P R, Bailey C J, Kwasowski P, Swanston-Flatt S K, Marks V. Abnormalities of GIP in spontaneous syndromes of obesity and diabetes in mice. Diabetes. 1983; 32: 433-5.

111. Kim S J, Nian C, McIntosh C H. Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. J Biol Chem. 2007; 282: 8557-67.

112. Kim S J, Nian C, McIntosh C H. Resistin is a key mediator of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of lipoprotein lipase (LPL) activity in adipocytes. J Biol Chem. 2007; 282: 34139-47.

113. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst J J, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. Nat Med. 2002; 8: 738-42.

114. Gault V A, Irwin N, Green B D, McCluskey J T, Greer B, Bailey C J, Harriott P, O'Harte F P, Flatt P R. Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3)GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes. Diabetes. 2005; 54: 2436-46.

115. Tseng C C, Kieffer T J, Jarboe L A, Usdin T B, Wolfe M M. Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist in the rat. J Clin Invest. 1996; 98: 2440-5.

116. Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 14843-7.

117. Calanna S, Urbano F, Piro S, Zagami RM, Di Pino A, Spadaro L, Purrello F, Rabuazzo AM. Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome. Eur J Endocrinol. 2012; 166: 917-22.

118. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, Meier JJ. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. Diabetes. 2008; 57: 678-87.

119. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Indicadores sociais municipais: Uma análise do censo demográfico 2010, Rio de Janeiro (RJ); 2011.

120. Baxes GA. Digital Image Processing: principles and applications. Wiley; 1994.

121. Castleman K. Digital Image Processing, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs,NJ; 1996.

122. Russ JC. The Image Processing Handbook, CRC Press, Boca Raton; 1995.

123. Barbato MT, Criado PR, Silva AK, Averbeck E, Guerini MB, Sa NB. Association of acanthosis nigricans and skin tags with insulin resistance. An Bras Dermatol. 2012;87(1):97-104.

124. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 1998; 352(9131):837-53.

125. Karmakar RN, Khandakar MR, Gangopadhyay PK, Ghosh K, Babu AS. Albuminuria and neuropathy in newly detected diabetics: profile and correlation. J Indian Med Assoc. 2011;109(6):396-9.

126. Koopman RJ, Mainous AG 3rd, Liszka HA, Colwell JA, Slate EH, Carnemolla MA, Everett CJ. Evidence of Nephropathy and Peripheral Neuropathy in US Adults With Undiagnosed Diabetes. Ann Fam Med. 2006; 4(5): 427–432.

127.Kahn C R, Flier J S, Bar R S, Archer J A, Gorden P, Martin M M, Roth J. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. N Engl J Med. 1976; 294: 739-45.

128. Bosseila, M, Shaker O. The tissue expression of insulin-like growth factor (IGF-I) in acrochordons. J Egypt wom Dermaml Soc. 2007; 4: 57-61.

129. Blakythy R, Jude EB, Gibson MJ, Boulton AJ, Ferguson MW. Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic scin and diabetic foot ulcers. J Pathol. 2000; 190: 589-94.

130. Prabakaran D, Wang B, Feuerstein J D, Sinclair J A, Bijpuria P, Jepeal L I, Wolfe M M. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates the proliferation of colorectal cancer cells. Regul Pept. 2010; 163: 74-80.

131. Knop F K, Vilsboll T, Holst J J. Incretin-based therapy of type 2 diabetes mellitus. Curr Protein Pept Sci. 2009; 10: 46-55.

ANEXO 1

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **20.06.11** tomou ciência do Projeto nº **248/11** intitulado "**Acantose nigricans e acrocórdons: marcadores imunohistoquímicos cutâneos e correlação das dermatoses com a presença de resistência à insulina em pacientes obesos e não-obesos**", vinculado à pós-graduação do Departamento de Dermatologia, que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Catarina, sendo realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

Pesquisador(a) Responsável: Paulo Ricardo Criado
Pesquisador(a) Executanate : Mariana Tremel Barbato

CEP-FMUSP, 20 de junho de 2011.

Prof. Dr.Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Sr.(Sra.) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa- **Associação de acrocórdones e resistência à insulina: imunomarcação cutânea do peptídeo insulinotrópico dependente de glicose**

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine uma das folhas do documento que ficará com o pesquisador. A outra folha é sua. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, o Sr.(Sra.) poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com as pesquisadoras ou com a instituição. Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato com a pesquisadora principal.

Pesquisadora principal: Dra. Mariana Tremel Barbato Barreto.

Endereço eletrônico: maribarbato@yahoo.com.br.

O objetivo será avaliar a presença de resistência insulina em pacientes que possuem acantose nigricans (presença de escurecimento nas dobras) e/ou acrocórdons (pequenos excessos de pele nas dobras), bem como verificar a presença de marcadores na biópsia da pele afetada e na pele não afetada pelas dermatoses.

Além da anotação de dados como peso e altura do paciente, será realizado uma entrevista para avaliar uso de medicações, história de doenças na família, entre outros. O sr.(a) será examinado e irá realizar uma biópsia de pele (retirada de dois fragmentos de 4mm de pele após anestesia do locais).

Caso ocorra algum tipo de desconforto em relação às perguntas integrantes do questionário, o(a) Sr.(Sra.) poderá interrompê-la, sem qualquer prejuízo aos seus cuidados e tratamentos na instituição.

Os dados obtidos na pesquisa serão sigilosos, mantidos em banco de dados e serão utilizados apenas para fins científicos. Não será divulgado qualquer dado que possa identificar o paciente. Além disso, a pesquisa não influencia na conduta ou tratamento da doença atual. O procedimento pode ser desconfortável, principalmente no momento da anestesia (sensação de ardência) e poderá deixar uma pequena cicatriz no local da biópsia.

Não haverá nenhum custo ao participante da pesquisa, já que a entrevista será na própria data da consulta do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago. Qualquer pergunta em relação à pesquisa pode ser feita diretamente na consulta, ou pelo telefone diretamente com o pesquisador.

Eu,
_____,
RG_____, declaro que li as informações contidas no documento, fui devidamente informado(a) pelo(a) pesquisadora dos procedimentos que serão utilizados, não existindo qualquer custo/reembolso dos participantes, havendo confidencialidade da pesquisa e concordo em participar da mesma. Foi-me garantida a retirada do consentimento a qualquer momento, sem que isso me leve a ter qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma via deste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, com todos os esclarecimentos por escrito.

Florianópolis,____de_____de 20___.

ANEXO 2

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of the American Academy of Dermatology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Expression of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) in skin tags: another sign of insulin resistance in the skin?

Article Type: Dermatopathology

Keywords: Insulin resistance; skin; fibroma; incretins; peptides; glucose; immunohistochemistry.

Corresponding Author: Dr Mariana Tremel Barbato, MSs

Corresponding Author's Institution: USP

First Author: Mariana T Barbato, M.S

Order of Authors: Mariana T Barbato, M.S; Mariana Tremel Barbato, M.S; Paulo R Criado, PhD; Figueiredo P Cláudia, PhD; Gabriella Di Giunta, PhD

Abstract: Background: Acrochordons (AC) are pedunculated fibromas of the skin, 2 to 6mm found more often in areas of skin folds. It was suggested that these lesions are associated with insulin resistance (IR). The glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) is an incretin with insulinotropic action and was increased in obese and diabetic patients, but has never been demonstrated in the skin of patients with AC.
Objective: Identify the expression of GIP in AC lesions and in normal skin from the same patients as well as in the skin of patients without AC (control subjects) by immunohistochemical analysis, correlating this expression with the phenomenon of insulin resistance.
Methods: We studied 20 patients with AC and compared with the control group consisted of 11 patients without AC. Immunohistochemistry for GIP was performed (3mm biopsy): in skin of AC, in the skin of patients with AC in the area not affected by the skin lesions and in control skin group remaining plastic surgery.
Results: GIP expression of skin with AC was higher than the other 2 groups (control and normal), with p=0.034. When the AC group was divided into individuals with and without IR (based in HOMA index) GIP was lower in patients with IR, p=0.046.
Limitation: The Body Mass Index was not correlated with GIP expression.
Conclusion: The study of tissue incretin GIP, higher in AC lesions, confronting with IR parameters, shows lower expression in pacients with IR (HOMA>2.5) .

*Cover Letter
Click here to download Cover Letter: Cover letter JAAD Mariana.doc

October 20th, 2012

Dear Editor,

Please, find attached the original paper: **Expression of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) in skin tags: another sign of insulin resistance in the skin?,** which I am submitting to be considered for publication in the Journal of the American Academy of Dermatology, in the **Dermatopathology** section.

Acrochordons (Skin tags) are benign cutaneous tumors, that are most often found on the neck, axillae or groin. These lesions have been suggested to be associated with diabetes mellitus and obesity. GIP is found in diabetic patients and obese individuals, and to this date had not been demonstrated in acrochordons (AC). A recent clinical study have demonstrated an increased of GIP secretion associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome.

The study of tissue expression of GIP in the skin of patients with AC, comparing with the parameters of insulin resistance in peripheral blood, are likely to become important tool in the investigation of scenarios in which the clinical dermatological findings might or might not indicate the presence of insulin resistance.

All authors have approved the study submitted and are in compliance with the “Instructions to Authors” of the JAAD. We do not have relationships that might lead to a conflict of interest.

If accepted, the paper will not be published elsewhere in the same form, in English or any other language, without written consent of the copyright holder.

Sincerely yours,

Mariana Tremel Barbato, MD,

*Title Page
Click here to download Title Page: title page.docx

Expression of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) in skin tags: another sign of insulin resistance in the skin?

Mariana Tremel Barbato (Ms), Universidade de São Paulo

Paulo Ricardo Criado (PhD), Universidade de São Paulo

Cláudia Pinto Figueiredo (PhD), Universidade Federal do Rio de Janeiro

Gabriella Di Giunta (PhD), Universidade Federal de Santa Catarina

Word count:

Abstract: 236 words

Capsule: 72 words

Text: 1098 words

Correspondence:

Alves de Brito, 346 sala 101 centro.

CEP 88015440 Florianópolis-SC Brazil

Email: contato@marianabarbato.com.br

***Capsule summaries for all major articles**
Click here to download Capsule summaries for all major articles: Capsule.docx

Capsule

Acrochordons were associated with insulin resistance. Incretins are gut hormones that regulate the insulin that is secreted after eating. Elevated GIP plasma levels have been observed in type 2 diabetes and in impared glucose patients.

The study of tissue expression of GIP in acrochordons, comparing with the parameters of insulin resistance in peripheral blood, are likely to become important tool in the investigation of these patients.

The presence of incretin (GIP) in the skin lesions, and the low GIP in patients with insulin resistence reinforce the importance of incretins in the detection and prevention of diabetes type 2.

*Manuscript and References
Click here to download Manuscript and References: submit article.docx Click here to view linked References

Introduction

Acrochordons (Skin tags) are benign cutaneous tumors, that are most often found on the neck, axillae or groin [1]. Their sizes usually vary from 2 to 6 mm. It is believed that the insulin or insulin growth factors are implicated in pathogenesis of these lesions [1,2,3,4].

Acrochordons have been suggested to be associated with diabetes mellitus and obesity since Touraine et al. reported a possible association between them and endocrine diseases in 1951 [5].

Incretins are gut hormones that are secreted into the blood and regulate the amount of insulin that is secreted after eating [6]. The main incretins are represented by glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [6]. GIP is found in diabetic patients[7] and obese individuals [8,9], and to this date had not been demonstrated in acrochordons (AC).

Incretins response have also been poorly investigated in patients with insulin resistance [6]. The incretin effect accounts for 50–70% of insulin secretion after oral glucose load [9]. A recent clinical study have demonstrated an increased of GIP secretion associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome [9].

The study of tissue expression of GIP in the skin of patients with AC, comparing with the parameters of insulin resistance in peripheral blood, are likely to become important tool in the investigation of scenarios

in which the clinical dermatological findings might or might not indicate the presence of insulin resistance.

Methods

Twenty adults patients with acrochordons who wants to remove the lesions, attended our Clinic for dermatologic evaluation, were included in the study. All subjects gave written voluntary consent to participate in the study. Procedures were applied in agreement with the ethical guidelines of our Institutions. Body weights (kg) and heights (cm) were measured. Body mass index (BMI) was expressed as weight per height square (kg/m^2). Obesity was defined as BMI higher than 30. All blood samples were taken of the pacientes with acrochordons. Basal glycemia and insulinemia were monitored by Homeostasis Model Assessment index (HOMA). This index was calculated from insulin and glycemia values. A high HOMA index (> 2.5) generally reflects insulin resistance [10].

Lesions (skin tags) was removed, and a biopsy of 3mm was proceed in the same patient in a no exposed area to compare the results. Another group of 3mm of remanescent skin from patients without insulin resistence and achrocordons, who was submitted to a plastic surgery has been taken to compare as a normal group.

Subjects were divided into three groups as follows: *Group 1* achrocordons (n=20), *Group 2* normal skin (n=20) punch of normal skin in patients with acrochordons, and *Group 3* Control Group remanescent skin of plastic surgery of patients without achrocordons (n=9).

Histopathology

These fragments were then processed for histology. Sections of 3-mm thickness were cut and prepared on conventional glass slides. The histological sections were stained with haematoxylin–eosin or kept unstained for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using the following anti-human primary antibodies anti GIP rabbit, dilution ratio 1:600.High-temperature antigen retrieval was applied by immersing the slides in a water bath at 95–98_C in 10 mmol⁄L trisodium citrate buffer (pH 6.0) for 45 min. After overnight incubation with primary antibodies at 4_C, the slides were washed with PBS and incubated with the ready-touse secondary antibody EnVision Plus (Dako-Cytomation EnVision Doublestain System, Carpinteria, CA, USA) for 1 h at room temperature.Visualization was completed using 3,30 diaminobenzidine (DAB) (DakoCytomation) and

counterstained with Harris' haematoxylin solution. As controls, sections were incubated with an isotype-matched nonspecific immunoglobulin G (Santa Cruz Technology).

Microscopic analyses

Images of the sections were acquired using a digital camera (Sight DS-5ML1; Nikon, Melville,NY, USA) connected to a light microscope (Eclipse 50i; Nikon) under 20・, 40 magnification.

The program used to calculated the total area and the % of the colored area was Image J.

Results

Twenty patients with acrochordon was included and compared with 11 control skins (patients that was submitted to a plastic surgery).

The expresion of GIP was easily detected in skin tags. When compared with the normal (non lesion) skin from the same individuals and compared the skins of individuals without AC (controls). The % positive colored area of GIP in the epidermis (keratinocytes) of AC lesions was significantly

higher than in the epidermis of controls (normal skin) with p = 0.034 (Fig. 1 and 2).

The group of patients with lesions (AC) was separated into 2 groups: the group of patients with IR (HOMA > 2.5) and without RI (HOMA< 2.5). The expression of GIP was different between the two groups with p = 0.046. The IR group showed the % positive colored area lower than in the group without IR (control) (Figure 3).

Discussion

Elevated GIP plasma levels have already been observed in type 2 diabetes and in impared glucose patients, in these cases it is described as a compensatory mechanism by wich these subjects attempt to compensate for their reduced insulinotropic effect of GIP. The reduced insulinotropic response to GIP has been suggested as secondary to a reduction in the pancreatic beta cell mass and to impairments in the maximum insulin secretory capacity of the beta cell [9,11].

One hypothesis for increasing the expression of GIP in the epidermis could be to facilitate the influx of insulin into the skin (insulinotropic hormone). This mechanism results in proliferation of keratinocytes (epithelial hyperplasia) which corroborates with the findings of studies like

Prabakaram et al. in 2010 [12], demonstrating that hyperproliferation was stimulated by GIP in gut cells. This demonstrated the mitogenic effect of GIP in target tissues.

However, when we separate the patients with AC in groups of individuals with and without IR, we observed a lower expresion of GIP in patients with IR ($p = 0.04$). One hypothesis for the findings of this study would be that in subjects with AC increased expression of GIP in the epidermis could help to increase the influx of insulin (insulinotropic action), contributing to cell proliferation and pathophysiology of the lesions, but with the evolution of IR , the individual decreases the incretin GIP expression in the epidermis. The resons why this can happen are: defect in receptor expression GIP, decrease in GIP signal or a decrease of pancreatic beta cells [9].

The presence of incretin (GIP) in the skin lesions, and after the low GIP in pacientes with insulin resistence reinforce the Importance of skin tags in the detection and prevention of diabetes.

Conclusion

This was the first report of incretin GIP expression in human skin. The GIP expression in the epidermis was higher in acrochordons, but when the patient begin the insulin resistance the expresion of GIP decrease in AC, $p<0.05$.

References

1. Sudy E, Urbina F, Maliqueo M, Sir T. Screening of glucose/insulin metabolic alterations in men with multiple skin tags on the neck. J Dtsch Dermatol Ges. 2008; 6:852-6.
2. Jowkar F, Fallahi A, Namazi M R. Is there any relation between serum insulin and insulin-like growth factor-I in non-diabetic patients with skin tag? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009; 24: 73-4.
3. Mathur S K, Bhargava P. Insulin resistance and skin tags. Dermatology. 1997; 195: 184.
4. Barbato MT, Criado PR, Silva AK, Averbeck E, Guerini MB, Sa NB. Association of acanthosis nigricans and skin tags with insulin resistance. An Bras Dermatol. 2012;87(1):97-104.
5. Touraine A. A new hereditary chain; cutaneous fibromas, diabetes, obesity. Ann Dermatol Syphiligr. 1951; 78: 409-16.
6. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterol. 2007; 132: 2131–57.
7. Flatt P R, Bailey C J, Kwasowski P, Swanston-Flatt S K, Marks V. Abnormalities of GIP in spontaneous syndromes of obesity and diabetes in mice. Diabetes. 1983; 32: 433-5.
8. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst J J, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino

Y. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. Nat Med. 2002; 8: 738-42.

9. Calanna S, Urbano F, Piro S, Zagami RM, Di Pino A, Spadaro L, Purrello F, Rabuazzo AM. Elevated plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide associates with hyperinsulinemia in metabolic syndrome. Eur J Endocrinol. 2012; 166: 917-22.

10. Rezzonico J, Rezzonico M, Pusiol E, Pitoia F, Niepomniszcze H. High prevalence of thyroid nodules in patients with achrocordons (skin tags). Possible role of insulin-resistance. Medicina (B Aires). 2009; 69: 302-4.

11. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, Meier JJ. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. Diabetes. 2008; 57: 678-87.

12. Prabakaran D, Wang B, Feuerstein J D, Sinclair J A, Bijpuria P, Jepeal L I, Wolfe M M. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates the proliferation of colorectal cancer cells. Regul Pept. 2010; 163: 74-80.

Legends

Figure 1: Expression of GIP in the epidermis,

Figure 2: Graphic of the expresion of GIP in the control group (remanescent of plastic surgery), in the normal skin and in the skin of acrochordons.

Figure 3: Expression of GIP in the group acrochordons in patients with and without Insulin Resistance (IR).

Figure 1

Click here to download high resolution image

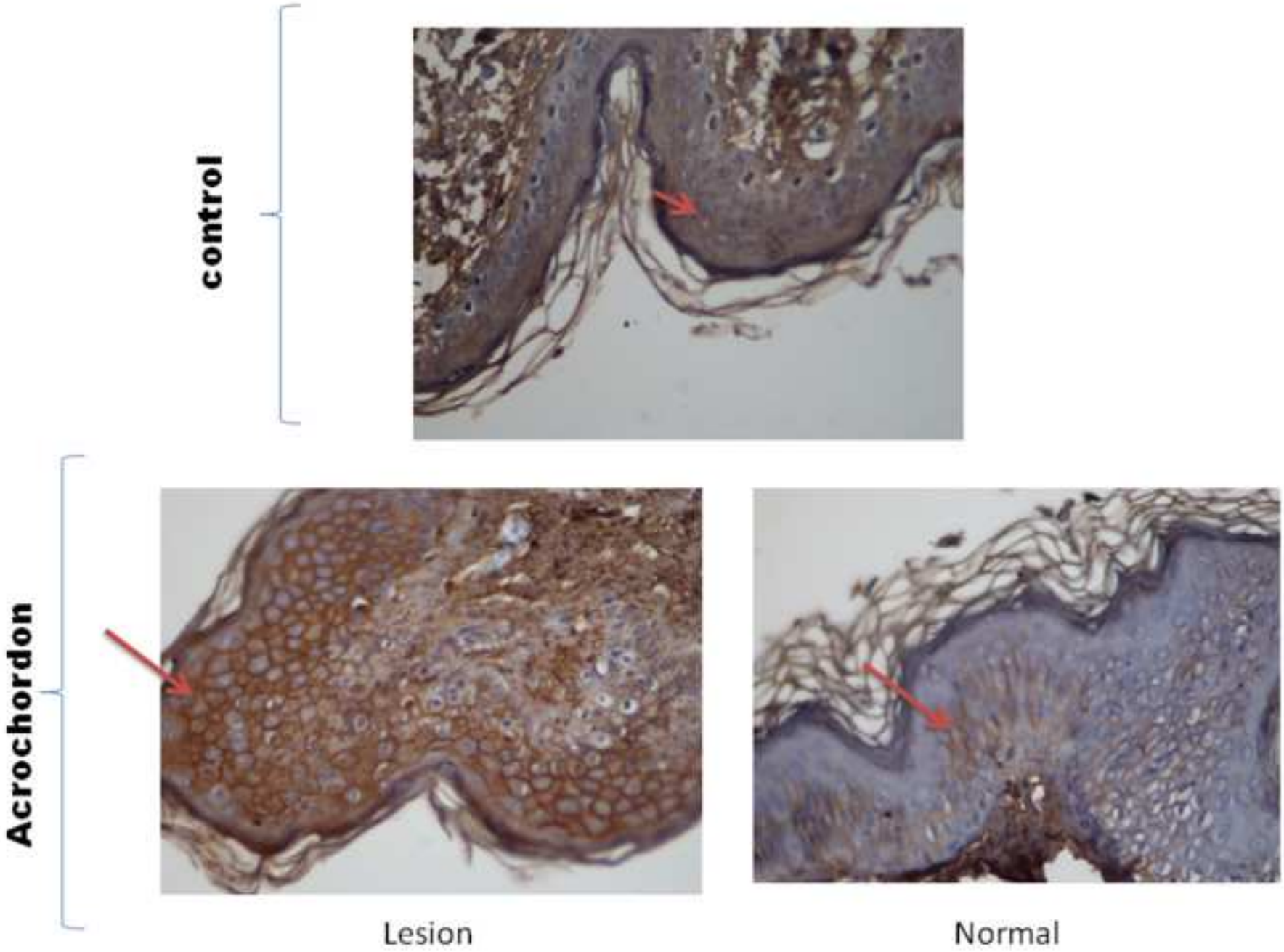


Figure 2
Click here to download high resolution image

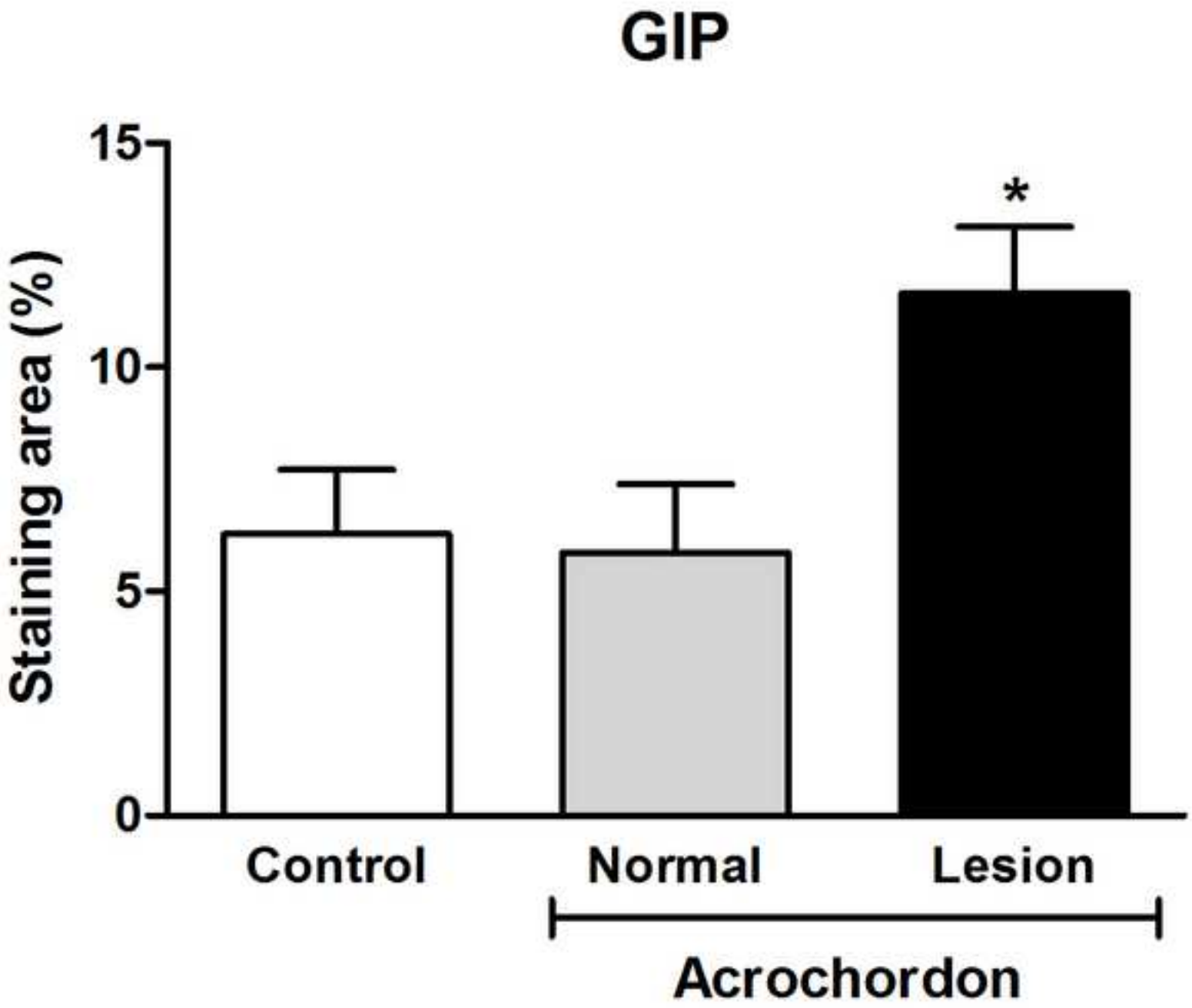
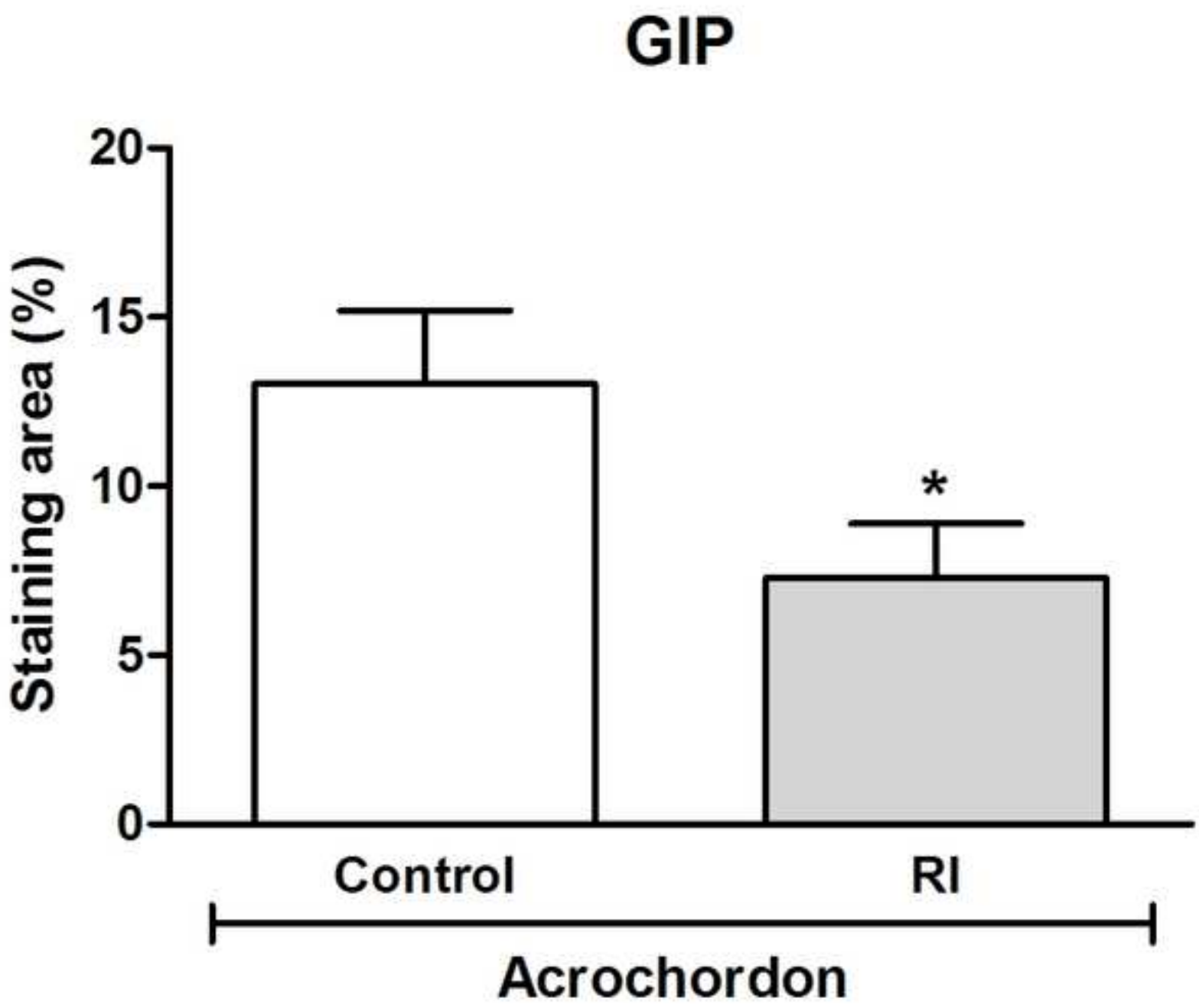


Figure 3
Click here to download high resolution image



*Authorship Statement
Click here to download Authorship Statement: author Mariana.docx

AUTHORSHIP DECLARATION

Each author must fill out a separate copy of this form.

All persons and only persons who meet authorship criteria should be listed as authors. Criteria for authorship include having performed at least one of the tasks listed in boxes #1-6 below and having read and approved the final version of the paper. All authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, and/or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Journal of the American Academy of Dermatology*. If this study has been or will be presented at a national meeting, indicate the appropriate information on the title page.

Acknowledgment: All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript, including but not limited to generating data, performing statistical analysis, and/or substantial editing that affects the content of the paper, but whose contribution is not sufficient to warrant inclusion as an author, should be listed in the Acknowledgment along with their affiliation(s) and funding source(s), if any, and have given the Journal permission to be named. If I (we) do not include an acknowledgment, that means I (we) have not received substantial contributions from nonauthors.

The author's name must be typed or clearly printed beneath the signature. Each author must indicate which of the following aspects of the work he or she participated in by checking the box(es) that apply. (It is not necessary for each author to check each of the boxes.) At least one of boxes 1-6 below must be applicable and checked by each author. Box number 9 must also be applicable to each author and must be checked unless it is not applicable.

- ☒ 1. I participated in designing the study.
- ☒ 2. I participated in generating the data for the study.
- ☒ 3. I participated in gathering the data for the study.
- ☒ 4. I participated in the analysis of the data.
- ☒ 5. I wrote the majority of the original draft of the paper.
- ☒ 6. I participated in writing the paper.
- ☒ 7. I have had access to all of the raw data of the study.
- ☒ 8. I have reviewed the pertinent raw data on which the results and conclusions of this study are based. MANDATORY FOR FIRST OR SENIOR AUTHOR.
- ☒ 9. I have approved the final version of this paper. MANDATORY FOR EACH AUTHOR.
- ☒ 10. I guarantee that all individuals who meet the Journal's authorship criteria are included as authors of this paper. MANDATORY FOR CORRESPONDING AUTHOR.
- ☐ 11. The name(s) and affiliation(s) of the individual(s) who performed the statistical analyses of this work are listed here. (To be filled in by corresponding author.)

Author(s) signature(s) — Date signed

Mariana Tremel Barbato — 10-20-2012

Signature

Mariana Tremel Barbato

Name (typed or printed)

*Authorship Statement 2

Click here to download Authorship Statement: author paulo.docx

AUTHORSHIP DECLARATION

Each author must fill out a separate copy of this form.

All persons and only persons who meet authorship criteria should be listed as authors. Criteria for authorship include having performed at least one of the tasks listed in boxes #1-6 below and having read and approved the final version of the paper. All authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, and/or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Journal of the American Academy of Dermatology*. If this study has been or will be presented at a national meeting, indicate the appropriate information on the title page.

Acknowledgment: All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript, including but not limited to generating data, performing statistical analysis, and/or substantial editing that affects the content of the paper, but whose contribution is not sufficient to warrant inclusion as an author, should be listed in the Acknowledgment along with their affiliation(s) and funding source(s), if any, and have given the Journal permission to be named. If I (we) do not include an acknowledgment, that means I (we) have not received substantial contributions from nonauthors.

The author's name must be typed or clearly printed beneath the signature. Each author must indicate which of the following aspects of the work he or she participated in by checking the box(es) that apply. (It is not necessary for each author to check each of the boxes.) At least one of boxes 1-6 below must be applicable and checked by each author. Box number 9 must also be applicable to each author and must be checked.

- [x] 1. I participated in designing the study.
- [ ] 2. I participated in generating the data for the study.
- [ ] 3. I participated in gathering the data for the study.
- [x] 4. I participated in the analysis of the data.
- [ ] 5. I wrote the majority of the original draft of the paper.
- [x] 6. I participated in writing the paper.
- [x] 7. I have had access to all of the raw data of the study.
- [x] 8. I have reviewed the pertinent raw data on which the results and conclusions of this study are based. MANDATORY FOR FIRST OR SENIOR AUTHOR.
- [x] 9. I have approved the final version of this paper. MANDATORY FOR EACH AUTHOR.
- [ ] 10. I guarantee that all individuals who meet the Journal's authorship criteria are included as authors of this paper. MANDATORY FOR CORRESPONDING AUTHOR.
- [ ] 11. The name(s) and affiliation(s) of the individual(s) who performed the statistical analyses of this work are listed here. (To be filled in by corresponding author.)

Author(s) signature(s) — Date signed: 10.20.2012

Signature

PAULO RICARDO CRUZADO

Name (typed or printed)

***Authorship Statement 3**

Click here to download Authorship Statement: author claudia.docx

AUTHORSHIP DECLARATION

Each author must fill out a separate copy of this form.

All persons and only persons who meet authorship criteria should be listed as authors. Criteria for authorship include having performed at least one of the tasks listed in boxes #1 to below and having read and approved the final version of the paper. All authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, and or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Journal of the American Academy of Dermatology*. If this study has been or will be presented at a national meeting, indicate the appropriate information on the title page.

Acknowledgment: All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript, including but not limited to generating data, performing statistical analysis, and or substantial editing that affects the content of the paper, but whose contribution is not sufficient to warrant inclusion as an author, should be listed in the Acknowledgment along with their affiliation(s) and funding source(s), if any, and have given the journal permission to be named. If I/we do not include an acknowledgment, that means I/we have not received substantial contributions from non-authors.

The author's name must be typed or clearly printed beneath the signature. Each author must indicate which of the following aspects of the work he or she participated in by checking the boxes that apply. It is not necessary for each author to check each of the boxes. At least one of boxes 1-6 below must be applicable and checked by each author. Box number 9 must also be applicable to each author and must be checked.

- [X] 1. I participated in designing the study
- [X] 2. I participated in generating the data for the study
- [ ] 3. I participated in gathering the data for the study
- [X] 4. I participated in the analysis of the data
- [ ] 5. I wrote the majority of the original draft of the paper
- [X] 6. I participated in writing the paper
- [ ] 7. I have had access to all of the raw data of the study
- [X] 8. I have reviewed the pertinent raw data on which the results and conclusions of this study are based. MANDATORY FOR FIRST OR SENIOR AUTHOR
- [X] 9. I have approved the final version of this paper. MANDATORY FOR EACH AUTHOR
- [X] 10. I guarantee that all individuals who meet the Journal's authorship criteria are included as authors of this paper. MANDATORY FOR CORRESPONDING AUTHOR
- [ ] 11. The name(s) and affiliation(s) of the individual(s) who performed the statistical analyses of this work are listed here: (To be filled in by corresponding author.)

Author(s) signature(s): Cláudia Figueiredo

Signature

Cláudia Pinto Figueiredo

Name (typed or printed)

Date signed: 11.21.2012

*Authorship Statement 4
Click here to download Authorship Statement: author gabriela.docx

AUTHORSHIP DECLARATION

Each author must fill out a separate copy of this form.

All persons and only persons who meet authorship criteria should be listed as authors. Criteria for authorship include having performed at least one of the tasks listed in boxes #1-6 below and having read and approved the final version of the paper. All authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, and/or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Journal of the American Academy of Dermatology*. If this study has been or will be presented at a national meeting, indicate the appropriate information on the title page.

Acknowledgment: All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript, including but not limited to generating data, performing statistical analysis, and/or substantial editing that affects the content of the paper, but whose contribution is not sufficient to warrant inclusion as an author, should be listed in the Acknowledgment along with their affiliation(s) and funding source(s), if any, and have given the Journal permission to be named. If I (we) do not include an acknowledgment, that means I (we) have not received substantial contributions from nonauthors.

The author's name must be typed or clearly printed beneath the signature. Each author must indicate which of the following aspects of the work he or she participated in by checking the box(es) that apply. (It is not necessary for each author to check each of the boxes.) At least one of boxes 1-6 below must be applicable and checked by each author. Box number 9 must also be applicable to each author and must be checked unless it is not applicable.

- ☒ 1. I participated in designing the study.
- ☒ 2. I participated in generating the data for the study.
- ☐ 3. I participated in gathering the data for the study.
- ☒ 4. I participated in the analysis of the data.
- ☐ 5. I wrote the majority of the original draft of the paper.
- ☒ 6. I participated in writing the paper.
- ☐ 7. I have had access to all of the raw data of the study.
- ☒ 8. I have reviewed the pertinent raw data on which the results and conclusions of this study are based. MANDATORY FOR FIRST OR SENIOR AUTHOR.
- ☒ 9. I have approved the final version of this paper. MANDATORY FOR EACH AUTHOR.
- ☒ 10. I guarantee that all individuals who meet the Journal's authorship criteria are included as authors of this paper. MANDATORY FOR CORRESPONDING AUTHOR.
- ☐ 11. The name(s) and affiliation(s) of the individual(s) who performed the statistical analyses of this work are listed here. (To be filled in by corresponding author.)

Author(s) signature(s)	Date signed
Signature	11.21.2012
GABRIELLA DI GIUNTA	11.21.2012
Name (typed or printed)	

*Authorship Statement all
Click here to download Authorship Statement: authorship all authors.docx

Authorship statement

All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in the *Journal of the American Academy of Dermatology*. If this study has been or will be presented at a national meeting, indicate the appropriate information on the title page.

Acknowledgment: All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript (including writing and editing assistance), but who are not authors, are named in the Acknowledgment and have given me (us) their written permission to be named. If I (we) do not include an acknowledgment, that means I (we) have not received substantial contributions from nonauthors.

Each author's name must be typed underneath the signature.

Author(s) signature(s)

Mariana Tremel Barbato _____

Paulo Ricardo Criado _____

Claudia Pinto Figueiredo _____

Gabriela Di Giunta _____

Date signed

Mariana Tremel Barbato 10.20.2012

Paulo Ricardo Criado 10.20.2012

Claudia Pinto Figueiredo 11.21.2012

Gabriela Di Giunta 11.21.2012

*Checklist
Click here to download Checklist: checklist.docx

JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF
DERMATOLOGY

REQUIRED SUBMISSION FORM AND CHECKLIST FOR AUTHORS

(Photocopy this page, complete all applicable sections, and submit with manuscript)

Corresponding Author: Mariana Tremel Barbato

Phone No.: (55)48 32236891 Fax No.: (55)48 32230229 E-mail: manibarbarbato@yahoo.com.br

- [x] Cover letter:
  - [x] Title, brief description of manuscript and its significance to dermatologists
  - [x] Suggested section
  - [x] Explanation of any conflicts of interest
  - [ ] Possible reviewers
  - [x] Signed copyright transfer statement (on or off-line submission)
- [x] Signed authorship statement from each author (on or off-line submission)
- [x] Signed conflict of interest statement from each author (on or off-line submission)
- [ ] Copy of Institutional Review Board approval for clinical research trials (on-line submission)
- [ ] CONSORT checklist for randomized trials (on-line submission)
- [x] Manuscript double-spaced with each section beginning on a new page
- [x] Number the pages in the upper right corner, beginning with the title page
- [x] Submission is line numbered
- [x] Title page
  - [x] Title of article
  - [x] Full name(s), academic degrees, and academic, institutional, and relevant corporate affiliations of author(s)
  - [x] All writers and contributors who participated in the preparation of the manuscript are listed as authors, (see author attestation form)
  - [x] Name, address, business telephone and fax numbers, and E-mail address of author to whom correspondence should be sent. Do not designate trainees or medical students for this purpose.
  - [x] Statement of all funding sources for this work (if none, please state)
  - [x] Publishable disclosure statement of potential conflicts of interest for each author. If none, please state: The authors have no conflict of interest to declare
  - [x] Statement on prior presentation
  - [ ] Reprint request line
  - [x] Text word count, number of references, tables, and figures
- [x] Abstract (double-spaced), including limitations section, starting on a separate sheet (when required by article type)
- [x] References (double-spaced), starting on a separate sheet
- [ ] Tables (double-spaced), each on a separate sheet
- [x] Figure legends (double-spaced), starting on a separate sheet
- [ ] Abbreviation and acronym list on separate sheet
- [ ] Patient consent letters (photographic and informed consent) (on or off-line submission)
- [ ] Permission to reproduce material published previously (on or off-line submission)
- [ ] Contents of the manuscript have not been previously published and are not currently submitted elsewhere
- [ ] All human and animal studies are approved by an Institutional Review Board.
- [x] I accept responsibility for the scientific integrity of the work described in this manuscript.
- [x] All listed authors have seen and approved of the manuscript and will sign off on any subsequent manuscript revisions.

Mariana Tremel Barbato — Signature of corresponding author who verifies that above is correct

10-20-2012 — Date

*Conflict of Interest Statement
Click here to download Conflict of Interest Statement: conflict.docx

Conflict of interest statement

I (we) certify that any affiliations with or involvement (eg, honoraria; education grants; speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements) in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript are disclosed in the submission letter and on the title page. If none, state "none" below.

Each author's name must be typed underneath the signature.

Author(s) signature(s)

Mariana Tremel Barbato (None) Mariana Tremel Barbato

Paulo Ricardo Criado (None) Paulo Ricardo Criado

Claudia Pinto Figueiredo (None) Claudia Pinto Figueiredo

Gabriela Di Giunta (None) Gabriela Di Giunta

Date signed

Mariana Tremel Barbato 10.20.2012

Paulo Ricardo Criado 10.20.2012

Claudia Pinto Figueiredo 11.21.2012

Gabriela Di Giunta 11.21.2012

*Copyright Transfer Statement
Click here to download Copyright Transfer Statement: transfer.docx

TRANSFER OF COPYRIGHT

I (we), the undersigned author(s), transfer all copyright ownership of the manuscript referenced above to the American Academy of Dermatology, in the event the work is published. I (we) warrant that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, and has not been published previously. I (we) have reviewed and approve the submitted version of the manuscript and agree to its publication in the *Journal of the American Academy of Dermatology*.

Each author's name must be typed underneath the signature.

Author(s) signature(s)	Date signed
Mariana Tremel Barbato	10.20.2012
Paulo Ricardo Criado	10.20.2012
Cláudio Figueiredo	11.21.2012
[illegible]	11.21.2012

US Federal Employees: If you are an employee of the US federal government, please sign the following statement: I was an employee of the US federal government when this work was conducted and prepared for publication; therefore the work lies within the public domain and is not subject to the Copyright Act. Ownership of copyright cannot be transferred. **If you are *not* a government employee, do not sign.**

Each author's name must be written in clear, capital letters underneath the signature.

Author(s) signature(s)	Date signed

Funding agency requirements and other policies

I have also been made aware of the journal's policies with respect to funding agency requirements such as the NIH Public Access policy, and the rapid publication 'Articles In Press' service. See elsevier.com for details.

FUNDING

☐ The underlying research reported in the article was funded by the US National Institutes of Health.

☐ The underlying research reported in the article was performed by a Howard Hughes Medical Institute investigator.