

Jessica Almeida Marani: Levantamento dos dados, ou análise e interpretação dos dados; redação do artigo ou revisão crítica do conteúdo intelectual importante; obtenção, análise e interpretação dos dados; revisão crítica da literatura; aprovação final da versão final do manuscrito.

Airton dos Santos Gon: Concepção e o desenho do estudo; análise estatística; redação do artigo ou revisão crítica do conteúdo intelectual importante; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; aprovação final da versão final do manuscrito.






Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

1. Tso S, Satchwell F, Moiz H, Hari T, Dhariwal S, Barlow R, et al. Erythroderma (exfoliative dermatitis). Part 1: underlying causes, clinical presentation and pathogenesis. *Clin Exp Dermatol*. 2021;46:1001–10.
2. Akhyani M, Ghodsi ZS, Toosi S, Dabbaghian H. Erythroderma: a clinical study of 97 cases. *BMC Dermatol*. 2005;5:5.
3. Fernandes NC, Pereira FSM, Maceira JP, Cuzzi T, Dresch TFLR, Araújo PP. Eritrodermia: estudo clínico-laboratorial e histopatológico de 170 casos. *An Bras Dermatol*. 2008;83:526–32.
4. Tan GF, Kong YL, Tan AS, Tey HL. Causes and features of erythroderma. *Ann Acad Med Singap*. 2014;43:391–4.
5. Cesar A, Cruz M, Mota A, Azevedo F. Erythroderma. A clinical and etiological study of 103 patients. *J Dermatol Case Rep*. 2016;10:1–9.

6. Miyashiro D, Sanches JA. Erythroderma: a prospective study of 309 patients followed for 12 years in a tertiary center. *Sci Rep*. 2020;10:9774.
7. Carrasquillo OY, Pabón-Cartagena G, Falto-Aizpurua LA, Santiago-Vázquez M, Cancel-Artau KJ, Arias-Berrios G, et al. Treatment of erythrodermic psoriasis with biologics: a systematic review. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83:151–8.
8. Pereyra-Rodríguez JJ, Domínguez-Cruz J, Armario-Hita JC, Villaverde RR. 104-week safety and effectiveness of dupilumab in the treatment of severe atopic dermatitis. The experience of 5 reference dermatology units in Spain. *An Bras Dermatol*. 2021;96:787–90.
9. Hama N, Abe R, Gibson A, Phillips EJ. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): clinical features and pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10:1155–67.
10. Zazzara MB, Palmer K, Vetrano DL, Carfi A, Onder G. Adverse drug reactions in older adults: a narrative review of the literature. *Eur Geriatr Med*. 2021;12:463–73.

Rogério Nabor Kondo , Betina Samesima e Singh , Milene Cripa Pizzato de Araújo , Victória Prudêncio Ferreira , Jessica Almeida Marani  e Airton dos Santos Gon 

Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

* Autor para correspondência.

E-mail: kondo.dermato@gmail.com (R.N. Kondo).

Recebido em 3 de maio de 2023; aceito em 10 de julho de 2023

<https://doi.org/10.1016/j.abdp.2024.04.016>
2666-2752/ © 2024 Sociedade Brasileira de Dermatologia.
Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Insulina inibe o crescimento tumoral de melanoma pela expressão do fator 4 ativador da transcrição, sem expressão detectável de fator de transcrição, CHOP: modelo *in vivo*☆☆



Prezado Editor,

Na primeira metade do século XX houve relatos¹ da redução do tamanho em diferentes tipos de tumores tratados com altas doses de insulina, incluindo um caso de melanoma

metastático.² Como esses tratamentos induziam estados hipoglicêmicos² e em virtude da íntima relação entre neoplasias e glicemia,³ estipulou-se que essa resposta ocorresse em decorrência dos baixos níveis de glicose sanguínea dos pacientes. No entanto, a mecânica dessa interação parece ser a expressão do fator 4 ativador da transcrição (F4AT) e outras proteínas associadas, a exemplo do fator de transcrição CHOP (FTCHOP).

Diante disso, o presente estudo buscou demonstrar os efeitos da insulina administrada em camundongos com melanoma, a relação da resposta tumoral com a glicemia sanguínea e a expressão proteica possivelmente envolvida nesse mecanismo.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (n° 23075.067738/2019-05). Linhagens celulares de melanoma murino (B16-F10) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC – Manassas, VA, EUA), cultivadas em meio DMEM e injetados subcutaneamente (6×10^6 células por animal) em camundongos C57BL/6, machos, com 8 a 12 semanas (obtidos junto ao Instituto Carlos Chagas, FioCruz – Paraná), totalizando 50 animais. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão (Purina) durante os experimentos. Após cinco dias,

DOI do artigo original: <https://doi.org/10.1016/j.abdp.2023.07.012>

☆ Como citar este artigo: do Prado D, Boia-Ferreira M, da Justa HC, Senff-Ribeiro A, Padilha SL. Insulin inhibits melanoma tumor growth through the expression of activating transcription factor 4, without detectable expression of transcription factor CHOP: an *in vivo* model. *An Bras Dermatol*. 2024;99:590–3.

☆☆ Trabalho realizado no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

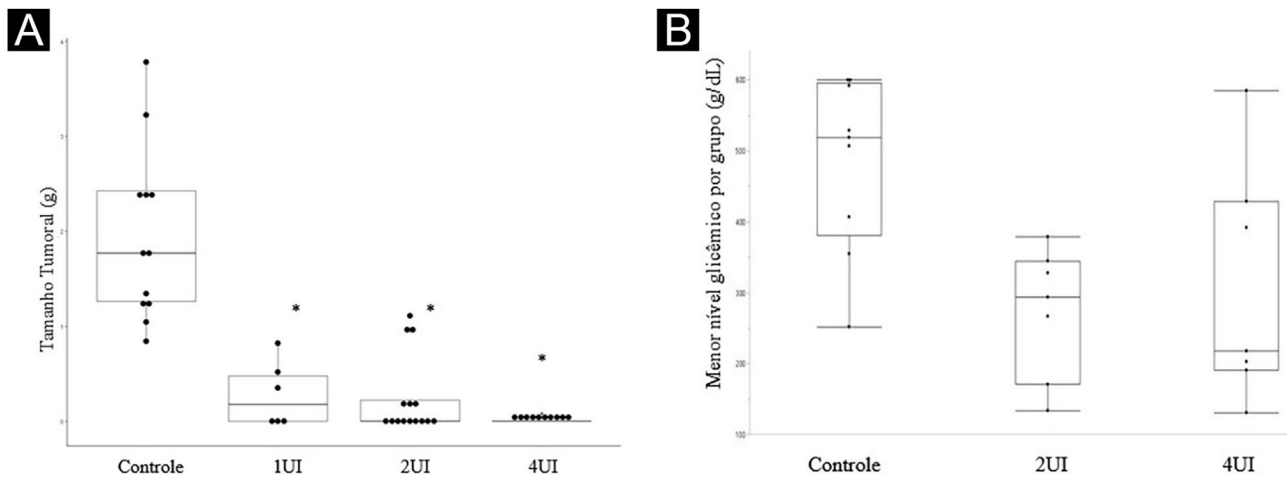


Figura 1 Insulina inibe o crescimento tumoral em modelo murino de melanoma (C57BL6/B16F10), sem causar hipoglicemia. (A) Boxplot representando a média dos tamanhos tumorais excisados em cada grupo experimental. A avaliação estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. (B) Representação em boxplot dos níveis glicêmicos aferidos nos camundongos. O grupo 1UI não teve a glicemia avaliada por ser dose padrão utilizada na prática médica. Os menores níveis de glicemia, em quaisquer grupos, não foram inferiores a 136 mg/dL, mostrando a ausência de hipoglicemia nos camundongos. *Valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

percebeu-se o desenvolvimento de tumor sólido de tamanho variável no local da aplicação. Insulina regular humana 100 UI/mL (Novolin R[®]) foi utilizada para o tratamento dos animais, diluída em soro glicosado 50%. Os camundongos foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento: 15 camundongos no grupo controle (0,1 mL de soro glicosado 50%); 10 camundongos grupo 1UI/kg (0,1 mL de solução a 0,1 UI/mL); 10 camundongos grupo 2UI/kg (0,1 mL de solução a 0,2 UI/kg); e 15 camundongos grupo 4UI/kg (0,1 mL de solução a 0,4 UI/mL). Foi administrada insulina intraperitonealmente por um total de 15 dias, divididos em três ciclos de cinco dias, com intervalos de dois dias sem a administração do hormônio ([Material Suplementar 1](#)). Os níveis glicêmicos foram medidos usando medidor de glicose (Accu Check Active, Roche Diagnostic, Alemanha), por meio de amostra sanguínea obtida através de um pequeno corte na cauda. A coleta ocorreu apenas nos grupos controle, grupo 2UI e grupo 4UI, três vezes por semana. Após o fim do tratamento, os animais foram sacrificados, utilizando-se a combinação de cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina (10%) em 50 mL (1:1).

O tecido tumoral foi extraído e a análise imuno-histoquímica foi realizada a partir de lâminas de secções tumorais dos tumores de B16-F10 obtidos nos experimentos *in vivo*. Foi realizada a preparação das lâminas de imuno-histoquímica segundo protocolo indexado ([Material Suplementar 2](#)) e utilizado anticorpos primários, anti-FTCHOP para ratos (Santa Cruz Biotechnology, cat.sc 7351) e anti-F4AT para ratos (Santa Cruz Biotechnology, cat.sc 390063). A quantificação imuno-histoquímica foi realizado no programa ImageJ Analisis Software, com o protocolo de Crowe and Yue.⁴ Lâminas de controle foram utilizadas para determinar parâmetros básicos e serviram como referencial para a expressão relativa. Também se avaliou área de imuno-histoquímica expressa e o número de núcleos por campo de lâmina avaliado. Foram utilizados três campos com ampliação de 20 × por lâmina para a análise.

A análise estatística e os gráficos foram feitos no programa R (R Development Core Team). Foi realizada a comparação pelo teste de Kruskal-Wallis e revisado pelo teste de Dunn para os tamanhos tumorais e para a expressão de proteínas, a contagem de núcleos e a área corada nas lâminas. Os níveis glicêmicos não foram contemplados pela análise estatística, uma vez que o objetivo do estudo não era demonstrar diferenças entre os grupos nessa variável, mas sim a ausência de hipoglicemia grave.

Os efeitos da insulina *in vivo* foram analisados a partir do modelo animal, com a mensuração do tamanho dos tumores ao final do tratamento. O gráfico de *box-plot* do tamanho dos tumores está representado na [figura 1A](#), enquanto os níveis glicêmicos obtidos nos animais estão representados na [figura 1B](#), considerando os valores de referência para os camundongos (150 mg/dL).

O número de animais mortos durante os experimentos foi de dois do grupo controle e quatro do grupo 1UI/kg. As mortes foram decorrentes da progressão tumoral nos animais. Essas mortes foram observadas ao longo da segunda semana dos experimentos, e os tumores desses animais não foram analisados.

A expressão de F4AT ([fig. 2A-B](#)) estava aumentada nos grupos 2UI/kg e 4UI/kg quando comparada com o grupo controle, com relevância estatística. As imagens obtidas para avaliação de FTCHOP ([fig. 2C-D](#)) demonstraram diferença estatística com o grupo 4UI em comparação com o grupo controle ([fig. 3](#)). Na análise qualitativa das lâminas, observou-se uma menor contagem de núcleos nos grupos tratados e maior área corada nos grupos 4UI (F4AT) e 1UI (FTCHOP) – [tabela 1](#).

Apesar de a literatura moderna estabelecer um papel neoplásico para a insulina, de modo que o uso do hormônio esteja relacionado ao surgimento/crescimento tumoral,^{5,6} o presente estudo encontra respaldo em dados do início do século XX,¹ em que a insulina apresentou atividade antineoplásica.

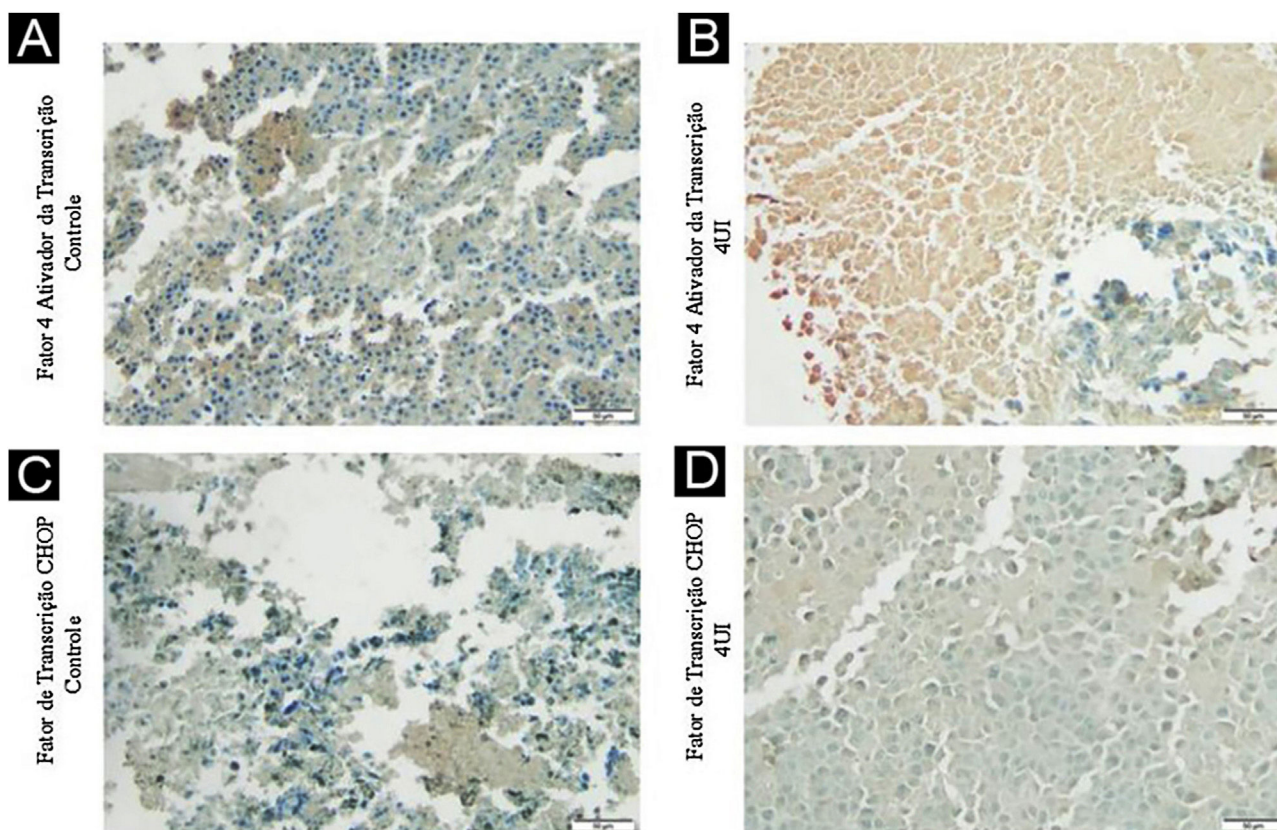


Figura 2 Análise imuno-histoquímica da expressão do F4AT e do FTCHOP. Os tecidos obtidos a partir de material tumoral dos grupos controle (A e C) e 4 UI/kg (B e D) foram avaliados a partir da expressão imuno-histoquímica de suas proteínas. As fotografias foram obtidas pelo microscópio Axiolab 5 microscopy (Zeiss) e analisadas com o programa ImageJ FIJI software. Os grupos controle e 4 UI/kg foram escolhidos para representar os extremos de dose.

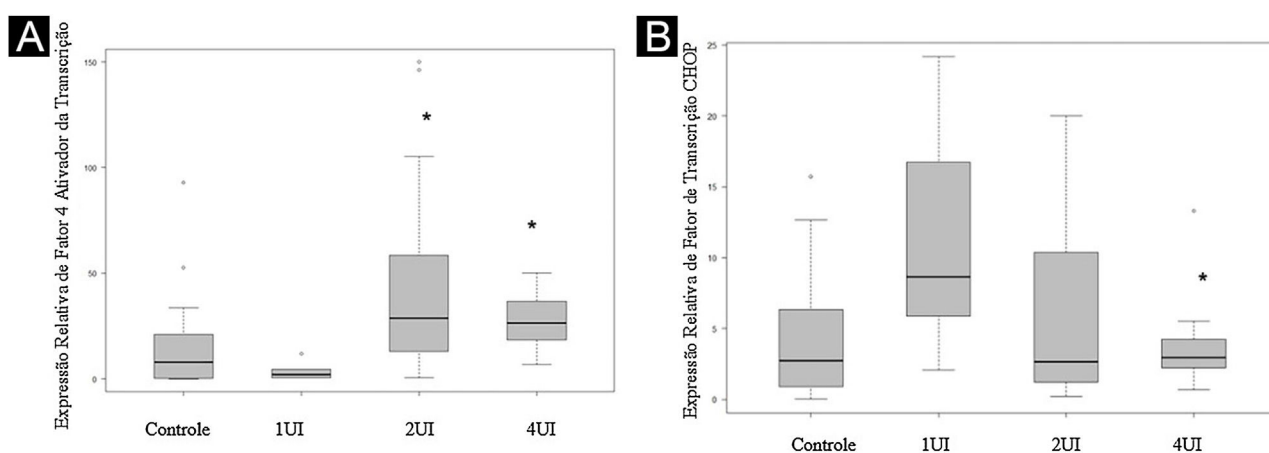


Figura 3 Expressão relativa do F4AT e do FTCHOP. Lâminas de controle foram utilizadas para definir os parâmetros de comparação. (A) Quantificação do sinal expresso pelo F4AT nas lâminas de diferentes grupos. (B) Quantificação do sinal expresso pelo FTCHOP nas lâminas de diferentes grupos. A dispersão dos valores relativos foi representada no gráfico. A avaliação estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. *Valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A expressão proteica de F4AT mediada pela insulina parece estar relacionada à ação antineoplásica, em vez da hipoglicemia. O F4AT desempenha papel dual dentro da

célula em situações de estresse do retículo endoplasmático (ERS),⁷ promovendo a sobrevivência celular ou iniciando a apoptose, sobretudo pela via PERK/eIF2a/F4AT/FTCHOP. A

Tabela 1 Análise imuno-histoquímica da expressão de fator de transcrição CHOP e fator 4 ativador da transcrição nos tecidos obtidos a partir de material tumoral dos grupos controles, 1UI/kg, 2UI/kg e 4UI/kg. Os dados demonstraram menor número de núcleos nos grupos tratados com insulina, enquanto maior área corada só foi observada na avaliação de F4AT e do grupo 1UI do FTCHOP

	Controle	1UI	2UI	4UI	Valor-p (teste de Kruskal-Wallis)
Média de área de IHQ					
F4AT	7,6%	2,0%	20,0%*	14,17%*	> 0,05
Número de núcleos por lâmina (média)					
F4AT	1614	1345,7	721,0*	114,5*	> 0,05
Média de área de IHQ					
FTCHOP	1,7%	4,4%*	2,4%	1,5%	> 0,05
Número de núcleos por lâmina (média)					
FTCHOP	2391	661,7*	785,9*	127,20*	> 0,05

* Valores com diferença significativa do grupo controle ($p < 0,05$).

literatura estipula que a insulina esteja ligada à expressão do F4AT em células saudáveis⁸ e tumorais,⁹ e esses dados são corroborados com achados do presente artigo. A expressão do FTCHOP apenas no grupo 4UI pode estar relacionada à quantidade de material tumoral nas lâminas do grupo 2UI, observada pelo percentual corado, bem como por outras vias para indução da apoptose nas células, como pela proteína TRAIL.¹⁰

As limitações do presente estudo correspondem ao fato de não ser avaliado se os tumores se tornariam refratários ao uso de insulina ou se haveria recidivas. Não foram avaliados o peso dos animais, o possível aumento da massa corporal nos grupos tratados com insulina, o tempo de sobrevivência dos animais após o tratamento nem a presença de outros marcadores celulares que poderiam estar envolvidos nos processos, como a proteína TRAIL. Outra limitação é a avaliação da expressão de proteínas por meio de lâminas imuno-histoquímicas.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Daniel do Prado: Concebeu a ideia deste trabalho; desenvolveu a teoria por trás dos experimentos; planejou o trabalho; escreveu o manuscrito; realizou a análise estatística e analisou os dados.

Marianna Boia: Cuidou dos experimentos; Contribuiu para a preparação das amostras e para interpretação dos dados.

Hanna Camara da Justa: Participou dos experimentos.

Andrea Senff Ribeiro: Contribuiu para a interpretação dos resultados e supervisionou o projeto.

Sergio Lunardon Padilha: Contribuiu para a interpretação dos resultados e supervisionou o projeto.

Conflito de interesses





Nenhum.

Anexo. Material suplementar

Pode consultar o material adicional para este artigo na sua versão eletrônica disponível em <https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.07.012>.

Referências

- Klement RJ. Wilhelm Brünings' forgotten contribution to the metabolic treatment of cancer utilizing hypoglycemia and a very low carbohydrate (ketogenic) diet. *J Tradit Complement Med.* 2018;9:192–200.
- Koroljow S. Two cases of malignant tumors with metastases apparently treated successfully with hypoglycemic coma. *Psychiatr Q.* 1962;36:261–70.
- Bose S, Zhang C, Le A. Glucose metabolism in cancer: the Warburg effect and beyond. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1311:3–15.
- Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol. *Bio Protoc.* 2019;9:e3465.
- Leitner BP, Siebel S, Akingbesote ND, Zhang X, Perry RJ. Insulin and cancer: a tangled web. *Biochem J.* 2022;479:583–607.
- Chiefari E, Mirabelli M, La Vignera S, Tanyolaç S, Foti DP, Aversa A, et al. Insulin resistance and cancer: in search for a causal link. *Intl J Mol Sci.* 2021;22:11137.
- Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Curr Mol Med.* 2016;16:533–44.
- Adams CM. Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the antianabolic actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2007;282:16744–53.
- Inageda K. Insulin modulates induction of glucose-regulated protein 78 during endoplasmic reticulum stress via augmentation of ATF4 expression in human neuroblastoma cells. *FEBS letters.* 2010;584:3649–54.
- Iurlaro R, Püschel F, León-Annicchiarico CL, O'Connor H, Martin SJ, Palou-Gramón D, et al. Glucose deprivation induces ATF4-mediated apoptosis through TRAIL death receptors. *Mol Cell Biol.* 2017;37:e00479–516.

Daniel do Prado ^{a,*}, Marianna Boia-Ferreira ^a, Hanna Camara da Justa ^b, Andrea Senff-Ribeiro ^b e Sérgio Lunardon Padilha ^a

^a Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

* Autor para correspondência.

E-mail: danieldoprado1@gmail.com (D. do Prado).

Recebido em 21 de fevereiro de 2023; aceito em 3 de julho de 2023

<https://doi.org/10.1016/j.abdp.2024.04.012>

2666-2752/ © 2024 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Predição de falha de enxertos de pele no couro cabeludo por análise intraoperatória com *laser speckle*☆☆☆



Prezado Editor,

Na reconstrução com enxerto de pele após excisão de neoplasia maligna cutânea pode ocorrer falha do enxerto, apesar da melhor técnica cirúrgica.^{1,2} Está bem estabelecido que um leito receptor mal perfundido apresenta maior risco de falha do enxerto de pele.³

O suprimento vascular para enxertos de pele no couro cabeludo deriva principalmente da gálea aponeurótica, mas em um cenário dermatológico, sua integridade é frequentemente comprometida.⁴ Na quarta semana, a taxa de falha dos enxertos de pele de espessura total (FTSG, do inglês *full-thickness skin grafts*) no couro cabeludo pode chegar a 22%.¹

O impacto do estado de perfusão do leito receptor na viabilidade do enxerto na quarta semana ainda precisava ser quantificado em humanos *in vivo*.³

Laser speckle contrast imaging (LSCI) é uma técnica não invasiva, em tempo real e sem contato, que torna possível o estudo da microcirculação em grandes áreas de superfície nos períodos intra e perioperatório.⁵ Em pesquisas anteriores, foi validado o estudo da microcirculação de diferentes tipos de enxertos de pele por meio da análise com LSCI.⁶ Seu papel na identificação de pacientes de alto risco para necrose do enxerto ainda precisa ser explorado.

Neste estudo piloto, os autores pretendem comparar os resultados dos FTSG no couro cabeludo com a estado da perfusão basal do leito do enxerto avaliada por LSCI. Também serão descritas as mudanças na perfusão do FTSG ao longo de quatro semanas.

Após aprovação do comitê de ética local e consentimento informado, quatro pacientes consecutivos com câncer de pele não melanoma no couro cabeludo foram incluídos: todos masculinos, com 71 anos (paciente 1), 90 anos (paciente 2), 81 anos (paciente 3) e 78 anos (paciente 4). As principais características e comorbidades dos pacientes são apresentadas na [tabela 1](#). Os tumores foram excisados após uso de lidocaína com infiltração de epinefrina, e FTSG foram

colhidos da região infraclavicular. Vinte minutos após a remoção da lesão e antes da sutura do enxerto de pele, a perfusão basal do leito da ferida cirúrgica (em unidades de perfusão arbitrária, UPA) foi medida com LSCI por 1 minuto, e a pressão arterial média (PAM, em mmHg) foi registrada. A relação UPA/PAM resultou na condutância vascular cutânea (CVC), em UPA/mmHg, possibilitando a comparação dos valores de perfusão dos pacientes. Por fim, o FTSG foi suturado e o curativo foi aplicado por uma semana.

Nos dias (D) 7, D14, D21 e D28, a perfusão do enxerto foi avaliada e comparada com a perfusão basal do leito do enxerto no D0. Também foram registradas imagens clínicas. As áreas de necrose foram calculadas com SketchAndCalc Area Calculator™ (versão 6.2.5, 2018).

Em todos os pacientes, a remoção do câncer de pele possibilitou a preservação de alguma gálea aponeurótica subjacente para suprimento vascular do enxerto de pele. Nenhum dos pacientes desenvolveu infecção, hematoma ou hemorragia pós-operatória.

As áreas do defeito primário mediam 8,4 cm² (paciente 1), 12,3 cm² (paciente 2), 5,8 cm² (paciente 3) e 8,7 cm² (paciente 4). A evolução dos valores da CVC ao longo das quatro semanas é mostrada na [figura 1](#). As imagens clínicas e LSCI sequenciais registradas no mesmo período são apresentadas na [figura 2](#).

Os valores basais de CVC do leito receptor foram 0,22 UPA/mmHg, 0,43 UPA/mmHg, 0,51 UPA/mmHg e 0,70 UPA/mmHg, respectivamente, nos pacientes 1, 2, 3 e 4. A extensão da necrose do enxerto no D28 diminuiu com o aumento da perfusão no leito receptor (CVC) no D0 – 82% no paciente 1, 48% no paciente 2, 16% no paciente 3 e 9% no paciente 4.

Após diminuição inicial do D0 ao D7, no D14 a CVC do enxerto superou a CVC basal do leito receptor em todos os pacientes. O aumento da perfusão do enxerto foi mais acentuado do D7 ao D21, com posterior tendência de diminuição (nos pacientes 2 e 4) ou pequeno aumento (nos pacientes 1 e 3). Quanto menor a área sob as curvas de perfusão, maior a extensão da necrose do enxerto no D28 em todos os pacientes.

A partir da análise das imagens de LSCI, foi observado que a partir do D14 as regiões do enxerto de pele mal perfundidas (preto a azulado) permaneceram relativamente estáveis em extensão. Essas regiões mal perfundidas no D14 sobrepuseram-se às regiões de necrose clínica no D28.

Existem algumas maneiras de avaliar a perfusão da pele de modo não invasivo, mas faltam evidências que apoiem seu uso no monitoramento da vascularização de enxertos de pele. A tomografia de coerência óptica requer avaliações

DOI do artigo original: <https://doi.org/10.1016/j.abdp.2023.05.009>

☆ Como citar este artigo: Pinho A, Brinca A, Figueiredo C, Flor D, Vieira R. Predicting skin graft failure on the scalp by intraoperative laser speckle analysis. *An Bras Dermatol*. 2024;99:594–6.

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.