UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO COMPARATIVO MORFOFUNCIONAL E EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE MELANOCORTINA DO TIPO 1 EM LESÕES DE MELASMA

LUCIANE DONIDA BARTOLI MIOT

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU - SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO COMPARATIVO MORFOFUNCIONAL E EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE MELANOCORTINA DO TIPO 1 EM LESÕES DE MELASMA

DOUTORANDA: LUCIANE DONIDA BARTOLI MIOT
ORIENTADORA: MARIÂNGELA ESTHER ALENCAR MARQUES
CO-ORIENTADORA: MÁRCIA GUIMARÃES DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Miot, Luciane Donida Bartoli.

Estudo comparativo morfofuncional e expressão de receptor de melanocortina do tipo 1 em lesões de melasma / Luciane Donida Bartoli Miot Miot. – Botucatu : [s.d.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Profª. Drª. Mariângela Esther Alencar Marques

Co-orientadores: Profª. Drª. Márcia Guimarães da Silva

Assunto CAPES: 40100006

1. Patologia. 2. Imunohistoquímica . 3. Reação em cadeia de polimerase.

CDD 616.07

Palavras-chave: Alfa-MSH; Imunohistoquímica; Melasma; Polimerase; Reação em cadeia de polimerase; Receptor tipo 1 de melanocortina.

DEDICATÓRIAS

Ao meu marido, Hélio,

Pelo constante e incansável incentivo, apoio, auxílio fundamental, paciência e amor incondicional. Sem sua presença ao meu lado, todo esse trabalho não seria possível e não teria o mesmo valor.

Aos meus pais, Neyde e Antenor e meu irmão, Antenor,

Pela presença constante e pelo amor e carinho que recebo a cada dia.

A minha filha Maria Clara,

Apesar de ainda não ter nascido, sentir sua presença, seus movimentos e seu crescimento a cada dia, tornaram o caminho final menos árduo e com a certeza de um futuro muito mais feliz, diante da realização de um grande sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me garantiu força e coragem para que eu conseguisse alcançar minhas metas, num momento tão especial da minha vida.

Aos pacientes, que entenderam a necessidade do trabalho e contribuíram para a sua realização.

Aos funcionários José Carlos Pedroso de Lima, Marcos Roberto Franchi e Carlos César Ramos, pela atenção, competência e disponibilidade sempre presentes.

Às secretárias do departamento de Patologia, Denise, Cícera e Lúcia, sempre atenciosas e dedicadas.

À Professora Maria Luiza Sartor de Oliveira (Iza), pelo auxílio e disponibilidade, diante das incontáveis tentativas de microdissecção a laser.

À doutoranda Jossimara Polettini, pela ajuda fundamental na realização das técnicas de biologia molecular envolvidas no projeto. Sempre disponível, incansável, deixando sua pesquisa e seus afazeres de lado para me ajudar.

À aluna de iniciação científica, graduanda do curso de ciências biológicas, Bruna Ribeiro de Andrade, pelo auxílio na coleta das amostras e transporte do material para biologia molecular.

Ao professor João Manuel Grisi Candeias, pelo auxílio e disponibilização dos equipamentos do laboratório de Virologia, para a realização da biologia molecular.

À professora Kunie Iabuki Rabello Coelho, pela disponibilização do laboratório e do microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Departamento de Dermatologia, pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa e disponibilização da estrutura ambulatorial.

Aos professores e funcionários do Instituto Ludwig, em São Paulo, pelos ensinamentos de técnicas envolvidas no projeto.

Ao grande mestre professor Sílvio Marques, amigo de todas as horas, grande incentivador até o final.

À Eliete Soares, fotógrafa do Departamento de Dermatologia, pela ajuda na documentação fotográfica dos pacientes envolvidos no estudo.

À Tânia Andrade, secretária da Pós-graduação da Patologia, pela atenção e paciência em todos os momentos de dúvidas.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, pela educação, atenção e carinho em todos os momentos.

A todos os amigos que ganhei durante a realização das disciplinas e corrida para obtenção dos créditos.

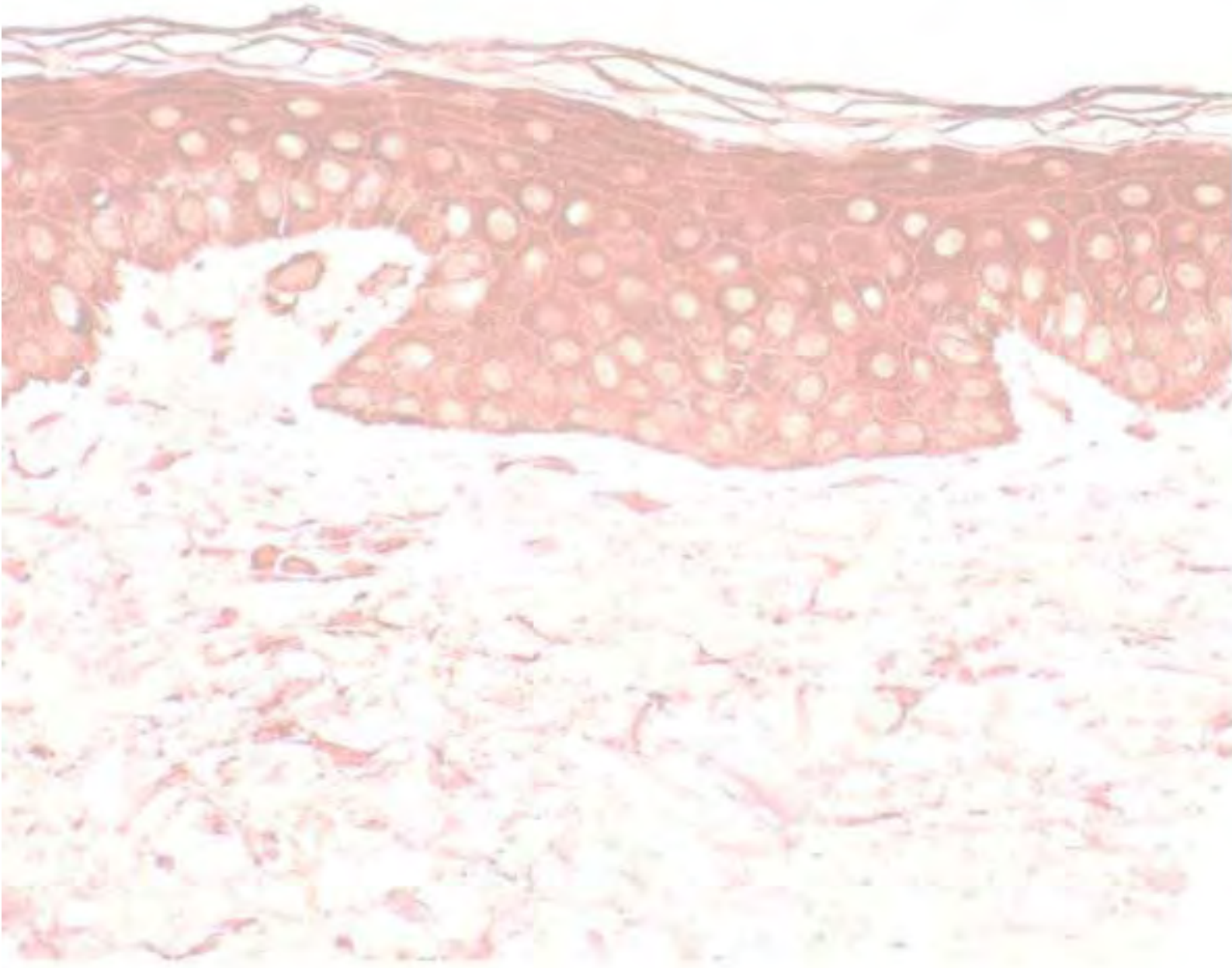
Enfim, e mais especialmente, as minhas orientadoras Mariângela Marques e Márcia Guimarães, que, antes de tudo, foram amigas constantes e dedicadas. A compreensão, o apoio e o incentivo que nunca faltaram, mesmo nos momentos de maior desalento. Carinho, competência e paciência foram fundamentais para que o projeto se realizasse.

Trabalho realizado no ambulatório do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp, laboratórios do Departamento de Patologia da FMB-Unesp e laboratório de virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB-Unesp, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 04/03135-5.

SUMÁRIO

Capítulo I – Revisão Bibliográfica.....7
Capítulo II – Objetivos.....36
Capítulo III – Manuscrito 1.....38
Capítulo IV – Manuscrito 2.....61
Capítulo V – Manuscrito 3.....68
Capítulo VI – Considerações Finais.....98
Anexos.....103
Anexo I.....104
Anexo II.....105
Anexo III.....106
Anexo IV.....107
Anexo V.....110

Capítulo I - Revisão Bibliográfica



1. INTRODUÇÃO

Melasma é uma dermatose comum que cursa com alteração da cor da pele normal resultante da hiperatividade melanocítica local e conseqüente hiperpigmentação melânica.

Acredita-se que haja clones de melanócitos hiperativos ou hiperfuncionantes, os quais promovem um aumento da pigmentação em certos locais específicos.

Habitualmente, caracteriza-se por manchas acastanhadas localizadas preferencialmente na face, embora possa acometer também região cervical, torácica anterior e membros superiores.

Grande parte de sua fisiopatogenia permanece desconhecida, e os principais elementos relacionados ao seu desenvolvimento são discutidos a seguir.

1.1 Cor da pele normal

A pele é o mais visível aspecto do fenótipo humano e sua cor é um de seus fatores mais variáveis. Muito pouco se conhece sobre as bases genéticas, evolução e os aspectos culturais relacionados ao estabelecimento dos padrões de cor da pele humana. [1,2]

Acredita-se que as variações na cor da pele sejam ganhos evolutivos e estejam relacionadas com a regulação da penetração da radiação ultravioleta (RUV) na pele.[3,4]

A síntese de vitamina D na pele, degradação de ácido fólico pela RUV, resistência à exposição solar direta e elementos culturais são argumentos que tentam explicar, através de várias teorias, a distribuição fenotípica da cor da pele em diferentes latitudes do planeta.[5,6]

A cor da pele humana normal é principalmente influenciada pela produção de melanina, um pigmento acastanhado denso, de alto peso molecular, que assume o aspecto enegrecido quanto mais concentrado estiver.[7-9]

No entanto, pigmentos exógenos amarelos, os carotenóides, contribuem também para a coloração da pele, assim como o vermelho endógeno, dado pela hemoglobina oxigenada nos capilares da derme e azul endógeno, decorrente da hemoglobina reduzida nas vênulas.[7,9]

Em humanos, a pigmentação da pele e dos cabelos é dependente da atividade melanogênica dentro dos melanócitos, da taxa de síntese de melanina, bem como do tamanho, número, composição e distribuição de partículas do citoplasma dos melanócitos denominadas melanossomas, além da natureza química da melanina que elas contêm.[8-11]

Os melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina e seu posterior armazenamento nos melanossomas, têm seu número relativamente constante em diferentes etnias.[9]

1.2 Melanócitos

Os melanócitos são células fenotipicamente importantes, responsáveis pela pigmentação da pele e dos pêlos, e, portanto, contribuem para a tonalidade cutânea, conferindo proteção direta aos danos causados pela radiação ultravioleta.[9]

São células dendríticas, embriologicamente derivadas dos melanoblastos, os quais se originam da crista neural, logo após fechamento do tubo neural. A migração dos melanoblastos da crista neural pode ocorrer para vários destinos, sendo que os sinalizadores que direcionam tal processo ainda precisam ser melhor caracterizados.[8,12]

Quando se tornam células completamente desenvolvidas ficam distribuídos em diversos locais: olhos (epitélio pigmentar retiniano, íris e coróide), ouvidos (estrias vasculares), sistema nervoso central (leptomeninges), matriz dos pêlos, mucosas e pele.[8,12]

Na pele, estão localizados na camada basal da epiderme e ocasionalmente na derme. Projetam seus dendritos através da camada malpighiana onde transferem seus melanossomas aos ceratinócitos (Figura 1). Essa associação melanócito-ceratinócito é denominada unidade epidérmico-melânica e é constituída, nos humanos, por um melanócito e cerca de trinta e seis ceratinócitos.[8,13]

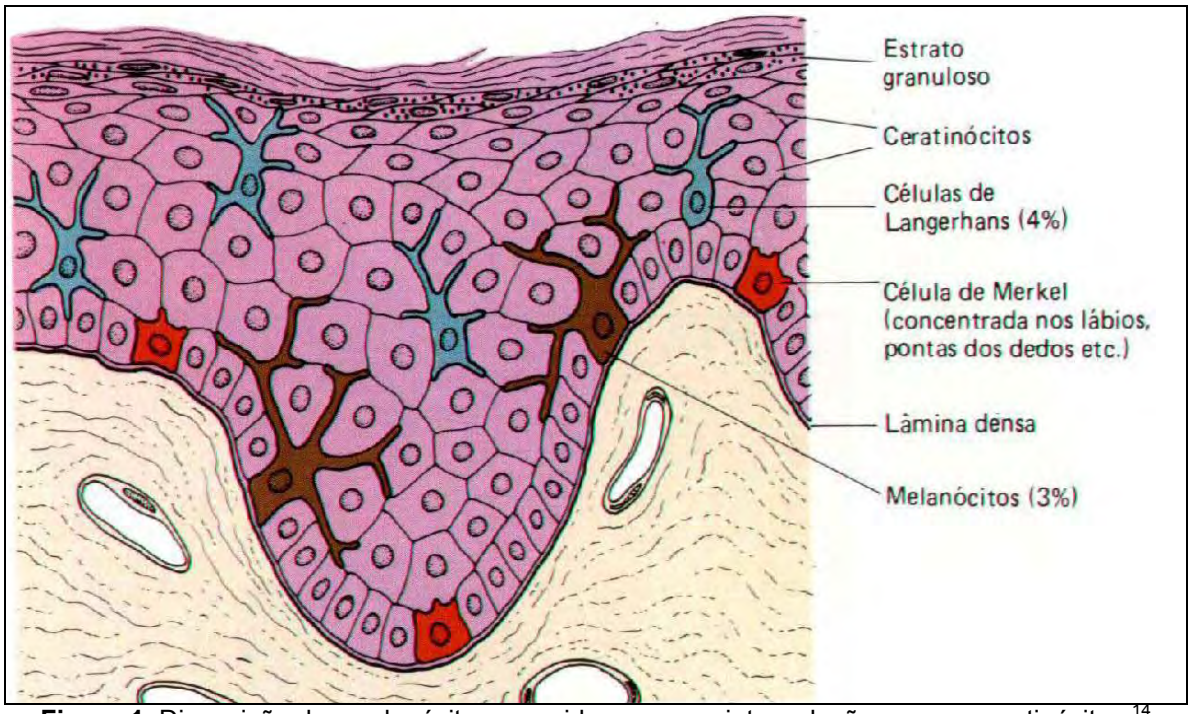


Figura 1. Disposição dos melanócitos na epiderme e sua inter-relação com os ceratinócitos.[14]

As células basais epidérmicas estão unidas às células vizinhas por estruturas específicas denominadas desmossomas e à membrana basal, por hemidesmossomas. Os melanócitos não estão fixos na epiderme, identificando-se apenas, pequeno desnível na posição dos melanócitos em relação ao alinhamento da camada basal, projetando-se, ligeiramente, em direção à derme (Figura 2)**.**[11]

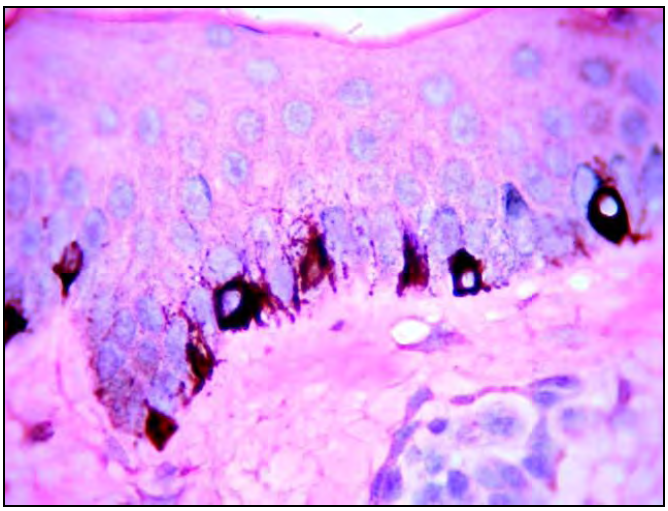


Figura 2. Disposição dos melanócitos na epiderme demonstrando discreta projeção em relação à derme (Melan-A/Giemsa ,1000X).

A densidade de melanócitos varia com os diferentes locais do corpo. Há em torno de dois mil ou mais melanócitos epidérmicos por milímetro quadrado de pele da cabeça e antebraço e cerca de mil no restante do corpo, em todas as raças. Esta regulação exata do número de melanócitos na epiderme parece ser mediada pelos ceratinócitos e por mediadores específicos como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2).[11]

O número de melanócitos diminui com a idade, em áreas não fotoexpostas, na proporção de 6 a 8% por década, sendo que as diferenças raciais na pigmentação não são devidas a uma marcante variação no número de melanócitos, mas sim no seu grau de atividade (síntese de melanina e melanossomas), na proporção dos subtipos de melanina (feomelanina e eumelanina), suas distribuições nos melanócitos e envolvimento de fatores ambientais como exposição solar, que estimulam diretamente a síntese de melanina.[11,15]

A melanina produzida nos melanócitos fica armazenada em estruturas intracitoplasmáticas específicas denominadas melanossomas.

1.3 Melanossomas

Melanossomas são organelas elípticas, altamente especializadas, nas quais ocorre a síntese e deposição de melanina (Figura 3), há o armazenamento de tirosinase sintetizada pelos ribossomos, e representam a sede dos fenômenos bioquímicos que originam a melanina.[7]

A síntese de melanina, que ocorre exclusivamente nos melanossomas, é dependente de vários genes.

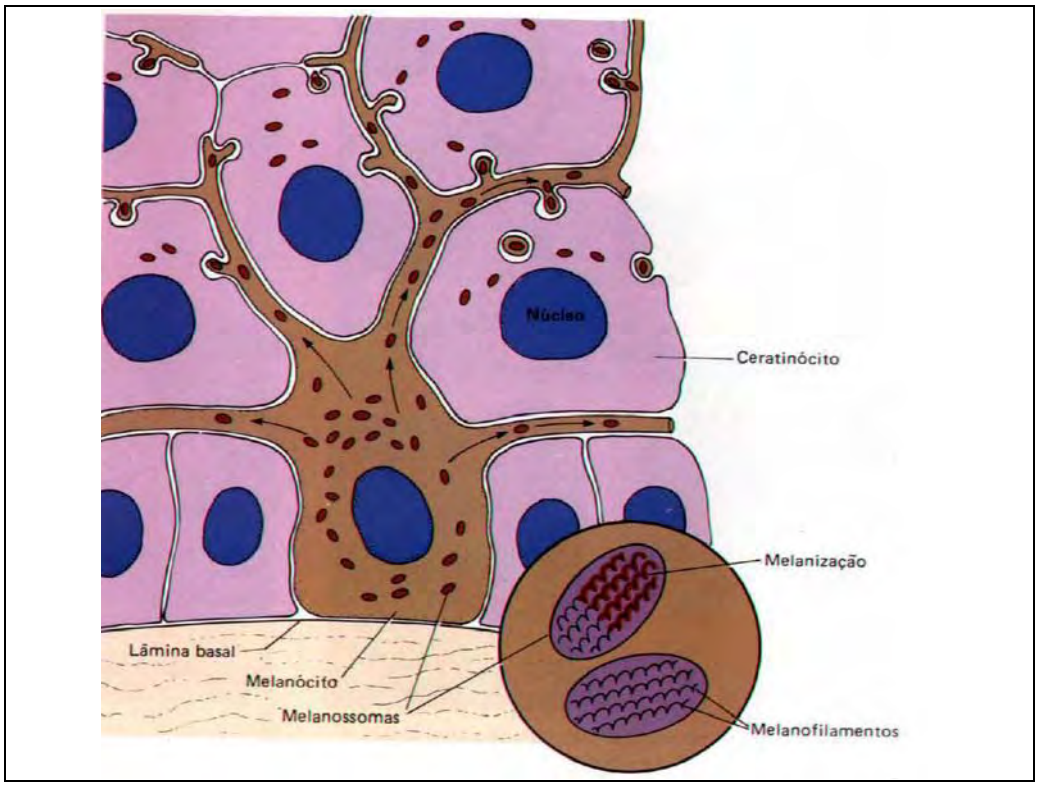


Figura 3. Esquema de produção e distribuição de melanina na epiderme, através dos melanossomas.[14]

Melanossomas desenvolvem-se através de uma série de estágios morfologicamente definidos (Figura 4), desde estruturas despigmentadas (estágio I) até organelas listradas repletas de melanina (estágio IV).[11,16]

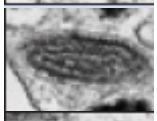
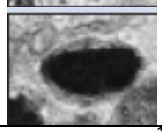
Estágio	Descrição	Microscopia Eletrônica
I	Esférico, sem melanina	
II	Oval, filamentos paralelos, grande atividade da tirosinase	
III	Oval, deposição moderada de melanina, grande atividade da tirosinase	
IV	Oval, deposição intensa de melanina, opaco à microscopia eletrônica, pequena atividade da tirosinase	

Figura 4. Características morfológicas dos melanossomas em seus diversos estágios.[16]

A diferença fenotípica fundamental entre as raças mais pigmentadas e menos pigmentadas não reside na produção de melanina ou no número de melanócitos, mas principalmente na qualidade de seus melanossomas (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos e distribuição de melanossomas de acordo com a pigmentação cutânea.[16]

Pigmentação da pele	Estágios predominantes	
	Melanócitos	Ceratinócitos
Clara	II, III	III
Média	II, III, IV	III, IV
Escura	IV>III	IV

Os melanossomas nos indivíduos negros são maiores e mais maduros do que nos brancos e são armazenados mais como unidades do que como grupamentos. A degradação dos melanossomas maiores nos ceratinócitos é retardada, o que também contribui para os níveis mais altos de pigmentação cutânea, nesses casos.[8] Os processos que levam a essa diferença de comportamento precisam ser melhor elucidados.

Nos melanossomas da pele normal, a melanina é extremamente densa, sendo um polímero nitrogenado, insolúvel e de alto peso molecular. A melanina é um pigmento que além de dar cor à pele, desempenha função protetora, filtrando e absorvendo as RUV. Desempenha, portanto, um importante papel fotoprotetor contra danos da RUV, como evidenciado por uma inversa correlação entre o conteúdo de melanina da pele humana e a incidência de carcinomas de pele e melanomas induzidos pela RUV.[11,17]

1.4 Melanina

A melanina é o principal pigmento biológico envolvido na pigmentação cutânea, sendo determinante das diferenças na coloração da pele.[11]

O elemento inicial do processo biossintético da melanina é a tirosina, um aminoácido essencial. A tirosina sofre atuação química da tirosinase, complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado nos ribossomos e transferido através do retículo endoplasmático para o Aparelho de Golgi, sendo aglomerado em unidades envoltas por membrana, ou seja, os melanossomas.[11]

Os três membros da família relacionada a tirosinase (tirosinase, Tyrp 1 – tirosinase relacionada a proteína 1 e Dct – dopacromo tautomerase) estão

envolvidos no processo de melanogênese levando a produção ou de eumelanina (marrom-preta) ou feomelanina (amarela-vermelha).[18]

Em presença de oxigênio molecular, a tirosinase oxida a tirosina em dopa (dioxifenilalanina) e esta em dopaquinona. A partir desse momento, a presença ou ausência de cisteína determina o rumo da reação para síntese de eumelanina ou feomelanina.[19]

Na ausência de cisteína (glutationa) a dopaquinona é convertida em ciclodopa (leucodopacromo) e esta em dopacromo. Há duas vias de degradação de dopacromo, uma que forma DHI (dopa,5,6 diidroxiindol) em maior proporção e outra que forma DHICA (5,6 diidroxiindol-2-ácido carboxílico) em menor quantidade. Este processo é catalisado pela dopacromo tautomerase (Tyrp 2-Dct). Finalmente, estes diiidroxiindóis são oxidados à melanina.[19]

A tirosinase relacionada a proteína 1 (Tyrp 1) é que parece estar envolvida na catalisação da oxidação da DHICA a eumelanina. Por outro lado, na presença de cisteína, dopaquinona rapidamente reage com tal substância para gerar 5-S-cisteinildopa e em menor proporção 2-S-cisteinildopa. Cisteinildopas são então oxidadas em intermediários benzotiazínicos e finalmente produzem feomelanina (Figura 5).[19]

A eumelanina é um polímero marrom, alcalino e insolúvel e a feomelanina é um pigmento alcalino, solúvel e amarelado. Pigmentos semelhantes à feomelanina, no entanto, podem ser estruturalmente derivados da eumelanina, assim como esta pode ser oxidada, na presença de íons metálicos, resultando em um pigmento solúvel e mais claro. Outro pigmento sulfurado, derivado da feomelanina, que pode ser encontrado em pequenas quantidades nos cabelos humanos vermelhos é denominado tricromo.[13]

Sendo assim, a melanogênese apresenta três passos distintos e importantes. O passo inicial é a produção de cisteinildopa, a qual continua tão intensa quanto for a quantidade de cisteína presente. O segundo passo é a oxidação da cisteinildopa para formar feomelanina, processo dependente da quantidade de cisteinildopa presente. E o terceiro e último passo é a produção de eumelanina, que somente tem início após a maioria da cisteinildopa ser depletada. Entretanto, parece que a eumelanina se deposita sobre a feomelanina pré-formada e a relação entre feo e eumelanina é determinada pela atividade da tirosinase e disponibilidade de cisteína.[19]

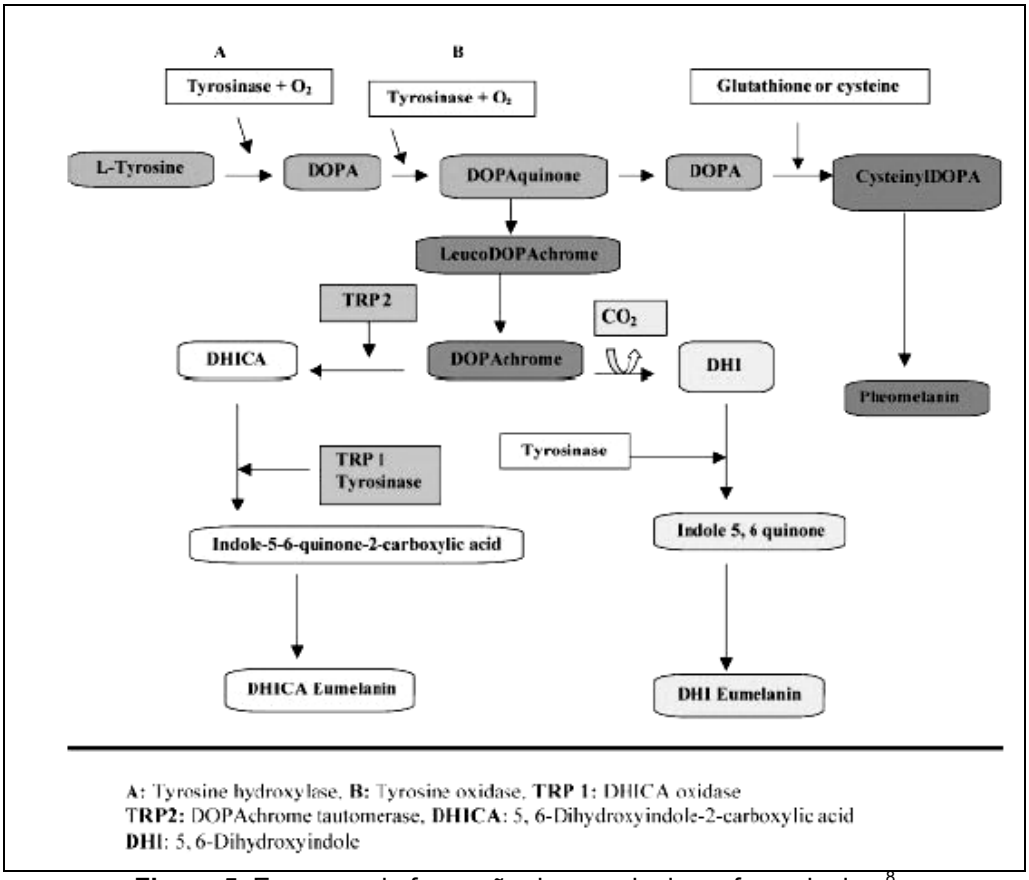


Figura 5. Esquema da formação da eumelanina e feomelanina.[8]

A eumelanina absorve e dispersa a luz ultravioleta, atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol. Em outras palavras, indivíduos com maior pigmentação tendem a se queimar menos e bronzeiam mais do que indivíduos mais claros. Portanto, a eumelanina apresenta uma maior função fotoprotetora que feomelanina.[15,20,21]

A feomelanina, por outro lado, tem um grande potencial em gerar radicais livres em resposta à radiação ultravioleta, os quais são capazes de causar danos ao DNA, podendo dessa forma contribuir para os efeitos fototóxicos da radiação ultravioleta. Isto explica porque pessoas com pele clara, as quais contêm relativamente altas quantidades de feomelanina, apresentam um risco aumentado de dano epidérmico induzido por ultravioleta, inclusive neoplasias.[20]

Melanócitos individuais tipicamente sintetizam eumelaninas e feomelaninas, com a taxa das duas sendo determinada por um balanço de variáveis, incluindo expressão de enzimas pigmentares e a disponibilidade da tirosinase e de agentes redutores específicos na célula.[9]

O receptor de melanocortina do tipo 1 (MC1-R) controla a taxa de eumelanina e de feomelanina dentro dos melanossomas. Essa proporção representa um importante determinante da sensibilidade solar no ser humano. Entretanto, é provável que a quantidade total de melanina produzida seja ainda mais importante que a relação entre os tipos de melanina.[5] Sabe-se que melanócitos derivados de pele intensamente pigmentada apresentam uma quantidade maior de melanina total e também uma taxa maior de eumelanina do que os melanócitos derivados de pele clara.[10]

A melanina total da pele resulta de uma mistura de monômeros de feomelanina e eumelanina e a proporção entre as duas é que determina a expressão fenotípica final da cor da pele e dos cabelos.

A redução na eumelanina e a presença predominante de feomelanina, como nos indivíduos ruivos, são reguladas em grande parte pelo receptor de melanocortina do tipo 1.[11]

Dois tipos de pigmentação melânica são a base para a cor normal da pele. Cor da pele constitutiva é a cor geneticamente determinada da pele saudável não submetida à radiação ultravioleta e que desempenha um papel essencial na fotoproteção à RUV que alcança a Terra, minimizando os danos ao DNA que levam ao aparecimento do câncer de pele.[7,17]

A cor da pele facultativa é a cor de pele mais intensa resultante de exposição solar ou de doenças pigmentantes e reflete a capacidade geneticamente determinada de bronzeamento em resposta à radiação ultravioleta. Dessa forma, o grau de “bronzeamento” é geneticamente determinado e é a base para divisão da pele normal em padrões de respostas adaptativas chamadas fototipos (Tabela 2).[7]

Tabela 2. Fototipos de pele segundo a classificação de Fitzpatrick.[7]

Fototipo	Características
I	Sempre queima, nunca bronzeia
II	Geralmente queima, às vezes bronzeia
III	Às vezes queima, geralmente bronzeia
IV	Nunca queima, sempre bronzeia
V	Moderada pigmentação constitucional
VI	Marcada pigmentação constitucional

Após a síntese completa da melanina, os melanossomas repletos desse pigmento são injetados no interior dos ceratinócitos da unidade epidérmico-melânica correspondente através dos prolongamentos dendríticos dos melanócitos (atividade citocrínica). Uma vez no interior dos ceratinócitos, os melanossomas tendem a distribuir-se no citoplasma, sobre a parte superior do núcleo, de forma a protegê-lo das radiações ultravioleta. Tem sido sugerido que o pigmento no interior destas células atua, também, como varredor de radicais livres fotoproduzidos, sempre no sentido de proteger o DNA celular.[12,22,23]

As propriedades de fotoproteção da melanina na pele humana têm sido bem documentadas e ocorrem pela absorção e dispersão tanto da luz ultravioleta quanto da luz visível. Essa absorção aumenta linearmente na faixa de 720-620 nm e então exponencialmente através de ondas mais curtas (300-600 nm).[17]

A melanina tem grande afinidade pelo DNA, sendo capaz de produzir espécies reativas de oxigênio em resposta à radiação ultravioleta A. Em indivíduos de pele clara parece que a maior incidência de melanomas pode ser decorrente não somente da falta de proteção natural, mas também de mutações aumentadas promovendo a formação de feomelanina e/ou intermediários da melanina.[8,11,24]

Estudos ultra-estruturais revelaram que eumelanossomas, que são geralmente produzidos na pele morena, permanecem intactos na epiderme após exposição à RUV, enquanto na pele clara, nenhum melanossoma intacto pode ser detectado após essa irradiação.[17]

Os principais fatores que regulam a quantidade e qualidade da melanina produzida pelos melanócitos incluem radiação ultravioleta, α-MSH (hormônio estimulante de melanócitos do tipo α ou melanocortina), ASP (proteína sinalizadora AGOUTI) e o receptor de melanocortina tipo 1 (MC1-R).[8,25]

1.5 Hormônio Estimulante de Melanócitos do tipo α e Receptor de Melanocortina do tipo 1

A pigmentação melânica da pele humana sofre intenso controle hormonal. Em 1967, Snell sumarizou o prevalente consenso acerca da ação hormonal nos melanócitos de mamíferos, particularmente em humanos.[26,27]

Injeções nos indivíduos humanos de α-MSH e β-MSH levaram a um escurecimento da pele que resultou da elevada melanogênese dentro dos melanócitos epidérmicos e aumentado transporte dos melanossomas derivados de melanócitos, através dos ceratinócitos, sem a necessidade de exposição à radiação ultravioleta. A hiperpigmentação cutânea foi também observada quando indivíduos humanos foram injetados com altas doses de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).[11,26,28,29]

O α-MSH é um tridecapeptídeo com uma seqüência idêntica aos 13 primeiros aminoácidos da adrenocorticotropina (ACTH). A clivagem proteolítica da proopiomelanocortina (POMC), na glândula pituitária, é a responsável pela origem de vários subprodutos, dentre eles o α-MSH. É sabido também que POMC é expressa e sofre clivagem em outros locais, incluindo o cérebro e a pele. O α-MSH foi o primeiro dos peptídeos derivados da POMC a ser identificado na pele.[20]

Ceratinócitos humanos são capazes de sintetizar α-MSH e β-MSH em quantidades fisiológicas. O α-MSH é também produzido em melanócitos e células de Langerhans.[9,11,17,25,30-34] Evidências indicam que estes hormônios têm um papel parácrino na regulação das funções dos melanócitos. Mais de 120 genes têm sido identificados e parecem regular a pigmentação, porém, os efeitos do α-MSH são mediados pelo MC1-R, o qual é expresso na superfície dos melanócitos e é considerado o ponto chave para pigmentação. Está também presente em outras células como monócitos, neutrófilos, células de glioma, astrócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e ceratinócitos. Desde que MC1-R tem uma distribuição tecidual ampla, é provável estar associado com um número grande de funções biológicas.[9,11,17,25,30,32-35]

Em 1992, Mountjoy et al.[36] da Universidade de Ciências da Saúde de Oregon, em Portland, relataram a clonagem do receptor hormonal de melanocortina do tipo 1 (MC1-R), em humanos e ratos. Demonstraram também que mutações no gene deste receptor proporcionavam alterações na cor dos pêlos em ratos. Em 1995, Valverde et al.[37] relataram uma associação semelhante entre formas aberrantes do receptor e variações na coloração da pele e cabelos nas pessoas.

Apesar da identificação de mais de 100 loci envolvidos na pigmentação dos vertebrados, o receptor de melanocortina 1 é consistentemente um lócus representativo e o maior determinante do fenótipo de pigmentação. A extensão do

lócus foi primeiramente identificada em ratos com base na alteração da coloração dos pêlos. Os mutantes recessivos tinham pêlos amarelados ou feomelanóticos, enquanto ratos tipo-selvagem tinham pêlos escuros/marrons ou eumelanóticos.[9]

No início dos anos 90 foi realizada a caracterização molecular do receptor de MSH, então chamado de receptor de melanocortina 1 e de seu antagonista, a AGOUTI proteína sinalizadora (ASP). Foi conhecido por muitos anos que dois loci estavam envolvidos na regulação qualitativa (eumelanina e feomelanina) e quantitativa da pigmentação de mamíferos, sendo a ASP produzida nos folículos e agindo nos melanócitos foliculares pela inibição da síntese de eumelanina.[17,38,39] Previamente à clonagem, dois receptores de melanocortina, receptor de MSH e ACTH, foram descobertos através de estudos farmacológicos e fisiológicos clássicos.

O sistema melanocortina consiste de peptídeos de várias formas de MSH (alfa, beta e gama) e ACTH, sendo descrita uma família com cinco receptores de melanocortina, ligados a proteína G, com sete domínios transmembrânicos (sete passagens pela membrana) e o antagonista endógeno de melanocortina (ASP).[17,38,39]

O MC1-R foi o primeiro receptor de melanocortina a ser clonado e foi isolado de uma linhagem celular de melanoma.[34] O gene do MC1-R humano está localizado no cromossomo 16q24.3 e mostra uma estrutura de leitura de 951 pares de base que codificam uma proteína de 317 aminoácidos. A seqüência protéica humana demonstra todas as características de receptores acoplados à proteína G, incluindo a presença de 7 fragmentos transmembrana e 2 locais de potencial N-glicosilação. A ocorrência de locais de ligação específicos de alta afinidade na maioria dos melanócitos humanos já fora conhecida antes mesmo da clonagem do gene MC1-R.[25,40,41] Entretanto, o número de locais de ligação é variável, podendo ser tão baixo quanto poucas centenas por célula, como detectado pela análise de Scatchard usando probes radiomarcados. Ao MC1-R se ligam não só o α-MSH, mas também ao ACTH, beta e gama MSH.[34]

Trata-se, então, de um gene altamente polimórfico na população branca e tais variações gênicas estão associadas com pele clara e cabelos avermelhados e agem na diminuição da habilidade da epiderme responder à RUV.

Atualmente, o gene do MC1-R é considerado um dos maiores marcadores de susceptibilidade para neoplasias malignas cutâneas, já que variantes gênicas estão

associadas com risco aumentado para melanoma e cânceres de pele não-melanoma.[17,30,34,42-44]

Outros estudos demonstraram que efélides e lentigos solares são distintos tipos de lesões pigmentadas que apresentam diferenças marcantes nas suas etiologias, porém variantes gênicas do MC1-R são um fator necessário para o desenvolvimento de efélides, enquanto que desempenham um papel menos importante no caso dos lentigos.[3,30,45,46]

Variação relacionada ao gene MC1-R é excepcionalmente alta entre caucasianos e tem um significante impacto no fenótipo pigmentar deste grupo étnico. Cabelos vermelhos (ruivos) têm sido relacionados a alguns alelos, mas recentes estudos indicam que os mesmos genótipos podem expressar diferentes cores de cabelos dependendo da população estudada.[3,44]

MC1-R está expresso abundantemente em células de melanoma humano e de ratos e em níveis significativamente mais baixos em melanócitos de ratos. Mais recentemente, foi demonstrado em glândulas normais da pele humana e folículos capilares, bem como em malformações e neoplasmas da pele.[34]

Na maioria dos indivíduos com pele clara, que não se bronzeiam, é encontrada uma variação na seqüência gênica do MC1-R clássico, que normalmente confere cabelos escuros e facilidade para se bronzear.[11] Desde que indivíduos com cabelos avermelhados e pele clara tenham predominância de feomelanina em cabelos e pele e/ou reduzida habilidade para sintetizar eumelanina, uma diminuição funcional do MC1-R com resultante redução na atividade da tirosinase melanotropina-induzida, associada com eumelanogênese, pode ser a chave na promoção da síntese de feomelanina dentro dos melanócitos humanos.

Sendo assim, o MC-1R dos melanócitos é indubitavelmente um importante elemento na regulação da pigmentação nos mamíferos, mas também um dos mais polimórficos.[11,20,30,32-34,47] Seqüências gênicas variantes são encontradas em mais de 80% dos indivíduos com cabelos vermelhos e pele clara, em menos de 20% dos indivíduos com cabelos castanhos ou pretos e em menos de 4% daqueles que mostram uma boa resposta para se bronzear.[34]

O α-MSH sinaliza através do MC1-R, ativando a adenilciclase (AC) e aumentando a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, resultando em produção do pigmento escuro de eumelanina (Figura 6). Se o MC1-R está envolvido em outras vias sinalizadoras, ainda permanece desconhecido, mas a ativação do

MC1-R influencia as quantidades relativas de feomelanina e eumelanina produzidas, sendo sua perda de atividade associada a cabelos vermelhos ou amarelos.[34,38,39,48-52]

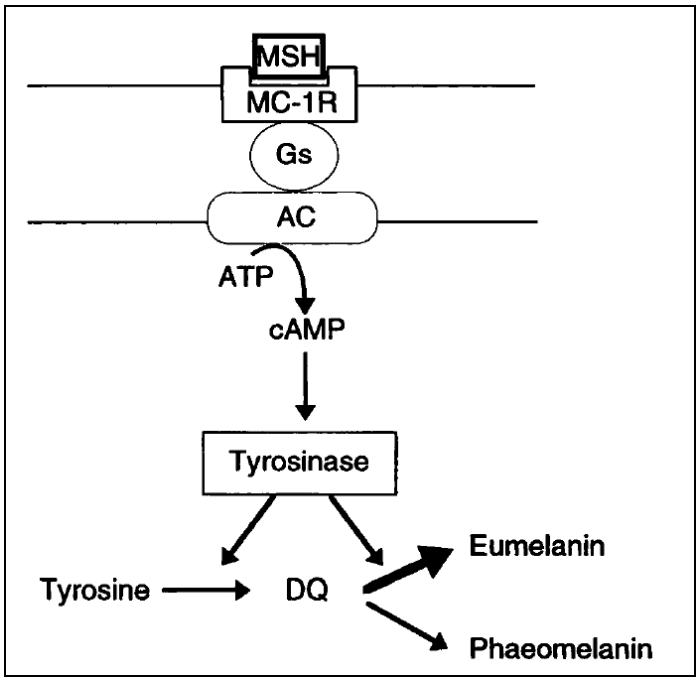


Figura 6. Esquema da sinalização do α-MSH via MC1-R, resultando na formação de eumelanina e feomelanina.[20]

Variantes do MC1-R têm sido associadas com herança de cabelo vermelho, na qual mais pigmento amarelo-avermelhado de feomelanina é produzido e que apresentam capacidade de bronzeamento muito pequena. Variantes R160W, R151C, D294H, R142H, 86insA e 537insC de MC1-R são os principais determinantes do fenótipo de cabelos vermelhos e pele clara. Trata-se de um fenótipo característico dos fototipos I e II, com maior chance de queimaduras solares e desenvolvimento de neoplasias cutâneas.[10,20,34]

O gene murino AGOUTI, o qual foi recentemente clonado, está localizado no cromossomo 2 e codifica uma proteína (ASP) composta por 131 aminoácidos e age como antagonista competitivo de MC1-R, bloqueando sua ativação pelo α-MSH. Entretanto, a troca entre eumelanogênese e feomelanogênese envolve a oposição de efeitos da ASP e α-MSH como ligantes para o MC1-R. A feomelanogênese pode ser estimulada por um tratamento *in vitro* com ASP recombinante purificada. Após tratamento com ASP, a expressão de genes codificando tirosinase e outras

proteínas melanogênicas é suprimida nos melanócitos, a qual exige outros fatores fisiológicos característicos de feomelanogênese *in vivo.* Em melanócitos humanos normais, onde o número de MC1-R expresso é relativamente baixo, ASP anula completamente os efeitos estimulatórios de α-MSH na proliferação melanocítica e melanogênese, pelo bloqueio da ligação do α-MSH ao MC1-R.[17,25,53]

A incapacidade de se bronzear nos indivíduos com variação no MC1-R é consistente com um papel crítico para o MSH/AMPc nesta resposta, mas alguns estudos indicam que o dano ao DNA do melanócito pode mediar a pigmentação induzida por RUV.[54]

1.6 Radiação Ultravioleta e Pigmentação

O espectro da radiação solar é amplo, variando desde os raios cósmicos (ultra raios X) até as radiações do infravermelho. As radiações de menor comprimento de onda, até 200 nm, não atingem a Terra, pois são absorvidas pelo oxigênio e ozônio atmosféricos.[17,55] A radiação ultravioleta e a luz visível situam-se entre 200 e 760 nm e constituem o espectro fotobiológico com o ultravioleta entre 200 e 400 nm e a visível entre 400 e 760 nm. Além desse limite, até 17000 nm está o infravermelho, que é um indutor de calor.[17,55]

Os efeitos agudos da exposição a radiação ultravioleta podem ser basicamente dois: queimadura e/ou bronzeamento. A resposta do indivíduo à exposição a RUV, ou seja, o quanto consegue de bronzeamento, é um dos maiores exemplos de adaptação ambiental dos humanos.[9]

Após uma única exposição à RUV, um aumento no tamanho dos melanócitos pode ser observado, acompanhado de um aumento da atividade da tirosinase. Exposições repetidas a RUV levam a um aumento no número de melanossomas estágio IV transferidos aos ceratinócitos, bem como um aumento no número de melanócitos ativos. Além disso, a densidade dos melanócitos, em estudos comparativos, é maior nas áreas fotoexpostas.[16]

Portanto, a radiação ultravioleta é um eficiente estimulante da pigmentação da pele em humanos e é responsável pela iniciação da resposta de bronzeamento. Vários mecanismos podem estar envolvidos e acredita-se que a resposta seja resultado de uma combinação de diferentes sinais agindo tanto diretamente quanto

indiretamente nos melanócitos. A ação indireta da radiação ultravioleta envolve a liberação de mediadores dos ceratinócitos na pele.[33,40]

A radiação ultravioleta B (UVB) na pele humana induz produção de α-MSH e ACTH nos melanócitos e ceratinócitos. O α-MSH estimula a atividade da tirosinase e a síntese de melanina *in vivo* e em cultura de melanócitos via MC1-R. Outros relatos indicam que a irradiação de melanócitos com RUV aumenta os níveis de RNAm de MC1-R. Além disso, a síntese de muitos fatores epidérmicos, incluindo α-MSH, ACTH e endotelina-1, é aumentada pela exposição a RUV, sugerindo uma importante influência desses mediadores na responsividade dos melanócitos a luz solar.[32,56-58]

O Ultravioleta C (UVC) (200-290 nm) é basicamente germicida, o UVB (290-320 nm) causa eritema, pigmentação e principalmente alterações que induzem ao câncer cutâneo e o ultravioleta A (UVA) (320-400 nm) tem maior penetração na pele, além da pigmentação e alterações cancerígenas, é o principal indutor de fotossensibilidade.[55]

O UVB é o principal responsável pelas queimaduras solares, com surgimento do eritema após um período de latência de 2 a 7 horas. Já o UVA, promove um eritema que surge mais tardiamente e pode tornar-se gradualmente mais intenso.[55]

A interação dos hormônios e radiação ultravioleta pode ser ilustrada no melasma. A radiação ultravioleta estimula a produção de melanocortina dentro dos melanócitos e ceratinócitos, o que justifica o envolvimento desse hormônio na patogênese do melasma, que se caracteriza basicamente por uma melanização epidérmica aumentada sem proliferação melanocítica.[11]

1.7 Melasma

Melasma é uma hipermelanose comum, adquirida, simétrica, caracterizada por máculas acastanhadas, mais ou menos escuras, de contornos irregulares, mas limites nítidos, nas áreas fotoexpostas, especialmente face, fronte, têmporas e mais raramente no nariz, pálpebras, mento e membros superiores (Figura 7).[59-62]

Trata-se de uma doença dermatológica facilmente diagnosticada ao exame clínico, porém, apresenta uma cronicidade característica, com recidivas freqüentes,

grande refratariedade aos tratamentos existentes e ainda muitos aspectos fisiopatológicos desconhecidos.[57]

Figura 7. Fotos clínicas de pacientes com melasma, demonstrando as principais topografias acometidas. **A.** Glabelar, zigomático e nasal. **B.** Frontal e zigomático. **C.** Glabelar, zigomático, labial superior e mentoniano. **D.** Zigomático, parotídeo, mentoniano e mandibular. **E.** Zigomático, parotídeo e mentoniano. **F.** Frontal, nasal, zigomático e mentoniano.

O nome melasma deriva do grego *melas,* significando negro. Cloasma é um termo que é usado com o mesmo sentido, sendo também derivado do grego *cloazein,* significando estar esverdeado. A denominação melasma se constitui, portanto, em uma designação mais adequada para a doença.[59]

Embora possa acometer ambos os sexos e todas as raças, é mais comum em mulheres jovens em idade fértil, podendo, porém, iniciar-se pós-menopausa; e em indivíduos de origem oriental ou hispânica vivendo em áreas tropicais. A idade de aparecimento situa-se entre 30-55 anos e o sexo masculino representa apenas 10% dos casos.[7,57,61,63,64]

Ainda que melasma seja mais freqüente entre latinos, a exata prevalência é desconhecida. Uma pesquisa conduzida num centro médico acadêmico indicou que aproximadamente 66% das mulheres mexicanas desenvolvem melasma durante a gravidez e um terço dessas mulheres mantém a pigmentação pelo resto da vida.[65-67]

Para uma dimensão desse acometimento, de acordo com um censo (US Census Bureau) de 2000, nos Estados Unidos, os latinos constituem 12,6% da população dos americanos e estima-se que o número aumente para 15,5% em 2010 e 24,4% em 2050.[65,67]

Não há um consenso sobre a classificação clínica do melasma. São reconhecidos dois principais padrões de melasma da face: centrofacial, que acomete a região central da fronte, região bucal, labial, região supra labial e região mentoniana; e malar, que acomete regiões zigomáticas. Alguns autores acrescentam ainda um terceiro padrão menos freqüente, chamado mandibular. Ponzio & Cruz observaram num estudo, 78,7% de melasmas centrais e 21,3% de periféricos.[59,63,68]

Há inúmeros fatores envolvidos na etiologia da doença, porém nenhum deles pode ser responsabilizado isoladamente pelo seu desenvolvimento. Dentre estes: influências genéticas, exposição à radiação ultravioleta, gravidez, terapias hormonais, cosméticos, drogas fototóxicas, endocrinopatias, fatores emocionais, medicações anti-convulsivantes e outros com valor histórico. Porém, parece que predisposição genética e exposição às radiações solares desempenham um papel importante, tendo em vista que as lesões de melasma são mais evidentes durante ou logo após períodos de exposição solar.[7,60,62,63,68-70]

Sacre et al., investigando o melasma idiopático, concluiu que as reservas tireotrófica, prolactínica e gonadotrófica apresentaram-se normais e que, como observou função ovariana e tireoidiana também normais, não foi possível estabelecer correlação entre os níveis hormonais encontrados e essa forma de melasma.[71]

Ao contrário do que ocorre na gravidez, o melasma induzido por anovulatórios não involui com suspensão da droga e, entre as pacientes que o apresentaram pelos contraceptivos, 87% também o tinham manifestado em gestações anteriores.[63]

A predisposição genética tem sido sugerida pelos relatos de ocorrência familiar. Um fator racial tem sido relatado pela ocorrência comum de melasma nos pacientes de origem hispânica. Sanchez et al. identificaram história familiar em mais

que 20% dos casos estudados, e todas as pacientes referiram exacerbação pela luz solar e uso de cosméticos.[59,72]

Vale destacar que, melasma é uma das dermatoses inestéticas que determinam uma grande procura ao atendimento dermatológico especializado, embora represente somente uma anormalidade comum e benigna da pigmentação. Talvez, isso se explique pela natureza cosmeticamente desfigurante e pelos efeitos emocionais e psicológicos nos indivíduos acometidos pelo problema, os quais muitas vezes, em virtude da insatisfação com a aparência, acabam se privando do convívio social, inclusive com casos de suicídio relatados.[65-67,69]

Embora a afecção tenha uma conotação, muitas vezes, somente do ponto de vista estético, tal preocupação pode ser muito importante e impactante na vida social, familiar e profissional dos indivíduos acometidos, provocando efeitos psicológicos que não podem ser negligenciados.[65,73]

Em 2003, o Melasqol, um novo instrumento de qualidade de vida relacionado à saúde para mulheres com melasma, foi publicado por Balkrishnan e colaboradores. Tal instrumento foi validado e demonstrou utilidade para monitorar o nível de impacto, causado pelo melasma, na qualidade de vida dos pacientes. Os principais setores da qualidade de vida que se mostraram afetados pelo melasma foram vida social, recreação e lazer e bem estar emocional. Em 2006, tal instrumento foi traduzido para o português e adaptado culturalmente, de acordo com as regras estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde.[65-67,74]

O tratamento do melasma é geralmente insatisfatório pela grande recorrência das lesões e pela ausência de uma alternativa de clareamento definitivo. Estudos clínicos controlados indicam a fotoproteção e uso de clareadores como as medidas de primeira linha no seu tratamento.[75-77] Entretanto, a discussão sobre as diversas modalidades terapêuticas, apesar do grande interesse clínico e acadêmico, foge do escopo desse texto.

Sendo assim, contribuir para o entendimento do mecanismo pelos quais os melanócitos promovem uma coloração fenotípica localizada ou como a cor da pele geneticamente pré-determinada se torna alterada para uma cor induzida por fatores como luz solar, hormônios, inflamações e outros, torna-se tarefa de grande importância. Sem dúvida, tais elucidações podem gerar importantes subsídios para inovações terapêuticas e como conseqüência, melhora na qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Em conjunto, os estudos comparativos de pele acometida por melasma e pele adjacente normal, verificaram que a afecção se caracteriza por hiperpigmentação epidérmica, aumento da quantidade de melanina em todas as camadas da epiderme, aumento no número de melanossomas e aumento da elastose dérmica.[57,78]

Estudos recentes indicam que inúmeros peptídeos exercem uma regulação autócrina ou parácrina dos melanócitos na pele humana e em diversas doenças pigmentares. São representados principalmente por: endotelina 1 (ET-1), fator estimulador de colônia granulócito-macrófago e fator *stem cell* tipo membrana (SCF). Também é conhecida a regulação por oncogene-α relacionado a crescimento, para interações entre melanócitos e ceratinócitos, fator de crescimento hepatocítico e fator *stem celll* tipo solúvel para interações entre fibroblastos e melanócitos.[1,79,80]

Esta inter-relação também envolve alguns receptores específicos expressos nos melanócitos, como o receptor de endotelina B, o receptor de fator *stem cell* e c-KIT. A *up* ou *downregulation* dessa rede interligada está intrinsicamente envolvida na estimulação das funções melanocíticas em várias desordens epidérmicas que cursam com alterações na pigmentação.[79,80]

Achados imunohistoquímicos sugerem que uma forte imunorreatividade de α-MSH na pele lesada de melasma é um dos maiores fatores na gênese dessa doença. A relação entre área fotoexposta e a maior imunorreatividade de α-MSH na pele lesada ainda não foi elucidada. Entretanto, a existência de um ainda desconhecido caminho sinalizador, com aumento de expressão de MC1-R, que pode desempenhar um papel significante nessa maior imunorreatividade ao α-MSH deve ser investigado. Há evidências de uma forte expressão de antígeno α-MSH nos ceratinócitos de pele lesada no melasma, sugerindo que α-MSH desempenha papel chave na hiperpigmentação de pele com melasma.[57,81]

Dessa forma, a avaliação da expressão de α-MSH e MC1-R na epiderme de lesões de melasma, comparados à pele sã perilesional, permitiria uma estimativa do papel da via do MC1-R na fisiopatogênese da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J* 2007; 21: 976-94.

2 Miot LDB, Miot HA, Silva MG et al. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol* 2007; 82: 529-64.

3 Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2007; 39: 1443-52.

4 Ortonne JP, ed. *Skin color variatons in humankind: an explanation?*, Vol. 2007. Atlanta: Pigmentary disorders academy, 2005.

5 Jablonski NG, Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol* 2000; 39: 57-106.

6 Relethford JH. Hemispheric difference in human skin color. *Am J Phys Anthropol* 1997; 104: 449-57.

7 Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP et al. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 936-44.

8 Sulaimon SS, Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol* 2003; 14: 57-65.

9 Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; 445: 843-50.

10 Abdel-Malek ZA, Scott MC, Furumura M et al. The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *J Cell Sci* 2001; 114: 1019-24.

11 Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick TB et al. Biology of Melanocytes. . In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 192-220.

12 Boissy RE. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatol Clin* 1988; 6: 161-73.

13 Bleehen SS, Ebling FJG, Champion RH. Disorders of Skin Color. In: *Champion RH, Burton JL, Ebling FJG. Eds Rook / Wilkinson / Ebling textbook of Dermatology.*, Vol. 2. Oxford: Blackwell Scientific publications, 1992: 1561-2.

14 Storm CA, Elder DE. Pele. In: *Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Scwarting R, Strayer D. Patologia: Bases clínico-patológicas da medicina*, Vol. 1. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006: 1224-91.

15 Jones K, Hughes J, Hong M et al. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 335-40.

16 Bolognia JL, Orlow SJ. Melanocyte biology. In: *Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Dermatology.*, Vol. 1. New York: Mosby, 2003.

17 Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA et al. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 2005; 571: 133-52.

18 Murisier F, Beermann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol* 2006; 21: 567-78.

19 Ito S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 230-6.

20 Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 1998; 11: 265-74.

21 Wagner JK, Parra EJ, H LN et al. Skin responses to ultraviolet radiation: effects of constitutive pigmentation, sex, and ancestry. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 385-90.

22 Hearing VJ. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci* 2005; 37: 3-14.

23 Boissy RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol* 2003; 12 Suppl 2: 5-12.

24 Szabo G, Hirobe T, Flynn EA et al. The biology of the melanocyte. *Prog Clin Biol Res* 1988; 256: 463-74.

25 Rouzaud F, Hearing VJ. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides* 2005; 26: 1858-70.

26 Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004; 84: 1155-228.

27 Klaus SN, Snell RS. The response of mammalian epidermal melanocytes in culture to hormones. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 352-8.

28 Barsh G, Attardi LD. A healthy tan? *N Engl J Med* 2007; 356: 2208-10.

29 Wickelgren I. Skin biology. A healthy tan? *Science* 2007; 315: 1214-6.

30 Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N et al. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1701-8.

31 Prusis P, Schioth HB, Muceniece R et al. Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide. *J Mol Graph Model* 1997; 15: 307-17, 34.

32 Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000; 13 Suppl 8: 156-62.

33 Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 217-29.

34 Voisey J, Carroll L, van Daal A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets* 2003; 4: 586-97.

35 Prusis P, Frandberg PA, Muceniece R et al. A three dimensional model for the interaction of MSH with the melanocortin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 205-10.

36 Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT et al. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992; 257: 1248-51.

37 Valverde P, Healy E, Jackson I et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; 11: 328-30.

38 Rees JL. The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 135-40.

39 Tan CP, McKee KK, Weinberg DH et al. Molecular analysis of a new splice variant of the human melanocortin-1 receptor. *FEBS Lett* 1999; 451: 137-41.

40 Rouzaud F, Costin GE, Yamaguchi Y et al. Regulation of constitutive and UVR-induced skin pigmentation by melanocortin 1 receptor isoforms. *Faseb J* 2006; 20: 1927-9.

41 Schaffer JV, Bolognia JL. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1477-85.

42 Loir B, Perez Sanchez C, Ghanem G et al. Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semiquantitative RT-PCR study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45: 1083-92.

43 Leonard JH, Marks LH, Chen W et al. Screening of human primary melanocytes of defined melanocortin-1 receptor genotype: pigmentation marker, ultrastructural and UV-survival studies. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 198-207.

44 Branicki W, Brudnik U, Kupiec T et al. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci* 2007; 52: 349-54.

45 Rees J. Genes for freckles. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 414.

46 Motokawa T, Kato T, Hashimoto Y et al. Effect of Val92Met and Arg163Gln variants of the MC1R gene on freckles and solar lentigines in Japanese. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 140-3.

47 Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A et al. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 117-33.

48 Ha T, Rees JL. Melanocortin 1 receptor: what's red got to do with it? *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 961-4.

49 Ha T, Naysmith L, Waterston K et al. Defining the quantitative contribution of the melanocortin 1 receptor (MC1R) to variation in pigmentary phenotype. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 994: 339-47.

50 Scott MC, Wakamatsu K, Ito S et al. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci* 2002; 115: 2349-55.

51 Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 433-9.

52 Gantz I, Yamada T, Tashiro T et al. Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by Fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 19: 394-5.

53 Hunt G, Thody AJ. Agouti protein can act independently of melanocyte-stimulating hormone to inhibit melanogenesis. *J Endocrinol* 1995; 147: R1-4.

54 D'Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R et al. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature* 2006; 443: 340-4.

55 Sampaio SAP, Rivitti EA. Fotodermatoses. In: *Sampaio SAP, Rivitti EA. Dermatologia*, Vol. 1. São Paulo: Artes médicas, 1998: 629-42.

56 Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y et al. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol* 1998; 139: 216-24.

57 Kang WH, Yoon KH, Lee ES et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002; 146: 228-37.

58 Bohm M, Metze D, Schulte U et al. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. *Exp Dermatol* 1999; 8: 453-61.

59 Sanchez NP, Pathak MA, Sato S et al. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 698-710.

60 Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1998; 139: 932.

61 Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int J Dermatol* 1998; 37: 897-903.

62 Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1453-7.

63 Ponzio HAS. Contribuição a classificação clínica e histopatológica dos melasmas. . In, Vol. Tese de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1995: 157.

64 Guevara IL, Pandya AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and a fluorinated steroid. *Int J Dermatol* 2001; 40: 212-5.

65 Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol* 2003; 149: 572-7.

66 Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol* 2006; 156 Suppl 1: 13-20.

67 Dominguez AR, Balkrishnan R, Ellzey AR et al. Melasma in Latina patients: cross-cultural adaptation and validation of a quality-of-life questionnaire in Spanish language. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 59-66.

68 Ponzio HAS, Cruz MF. Acurácia do exame sob a lâmpada de Wood na classificação dos cloasmas. *An Bras Dermatol* 1993; 68: 325-8.

69 Wolf R, Wolf D, Tamir A et al. Melasma: a mask of stress. *Br J Dermatol* 1991; 125: 192-3.

70 Robins AH. Melanosis after prolonged chlorpromazine therapy. *S Afr Med J* 1975; 49: 1521-4.

71 Sacre RC, Fernandes NC, Vaisman M et al. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. *An Bras Dermatol* 1996; 71: 195-8.

72 Scheinfeld NS. Melasma. *Skinmed* 2007; 6: 35-7.

73 Rigopoulos D, Gregoriou S, Katsambas A. Hyperpigmentation and melasma. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6: 195-202.

74 Grimes P, Nordlund JJ, Pandya AG et al. Increasing our understanding of pigmentary disorders. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: S255-61.

75 Pandya A, Berneburg M, Ortonne JP et al. Guidelines for clinical trials in melasma. Pigmentation Disorders Academy. *Br J Dermatol* 2006; 156 Suppl 1: 21-8.

76 Hexsel D, Arellano I, Rendon M. Ethnic considerations in the treatment of Hispanic and Latin-American patients with hyperpigmentation. *Br J Dermatol* 2006; 156 Suppl 1: 7-12.

77 Rendon M, Berneburg M, Arellano I et al. Treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: S272-81.

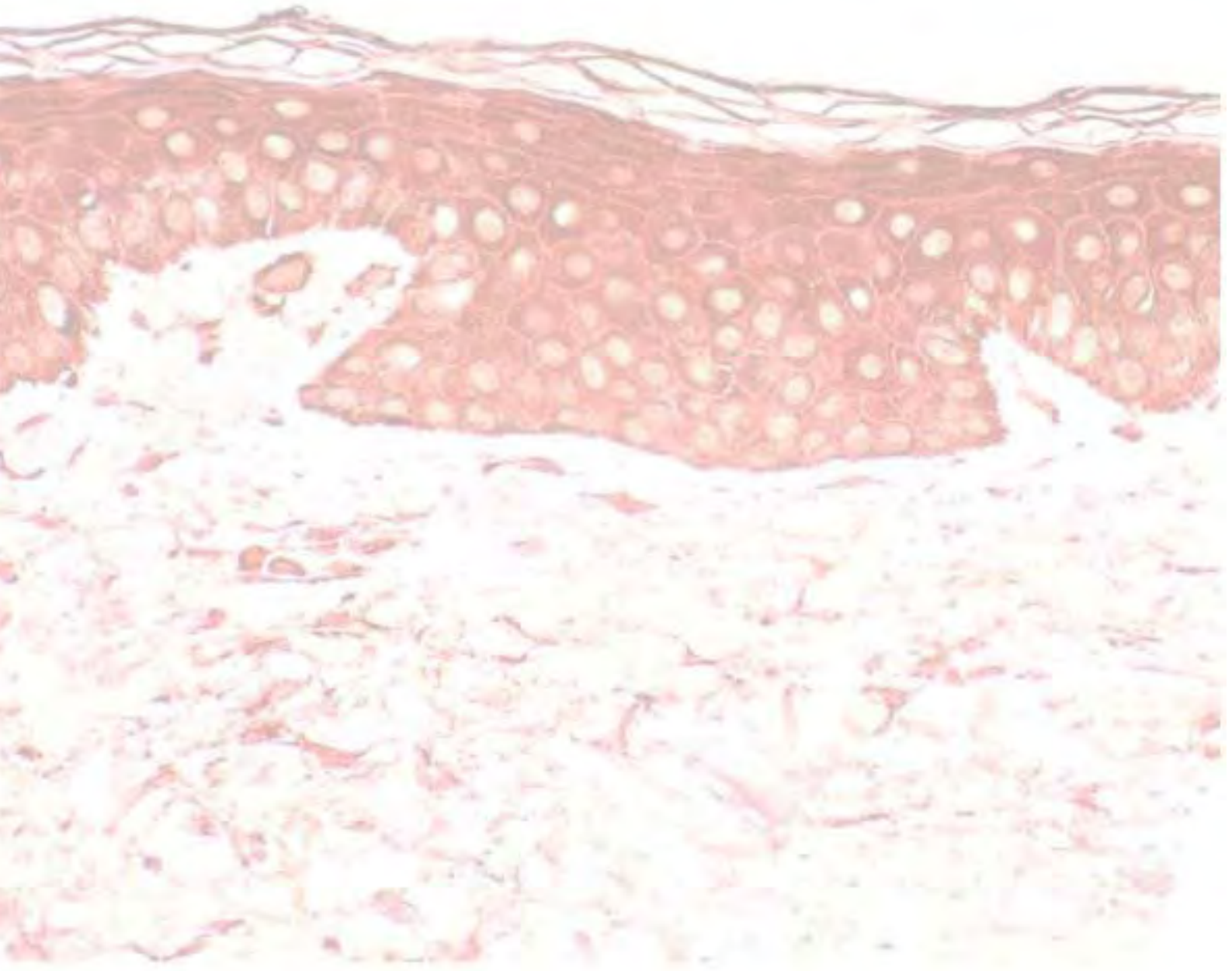
78 Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol* 1998; 139: 444-52.

79 Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 96-110.

80 Kang HY, Hwang JS, Lee JY et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol* 2006; 154: 1094-9.

81 Im S, Kim J, On WY et al. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol* 2002; 146: 165-7.

Capítulo II - Objetivos



OBJETIVOS

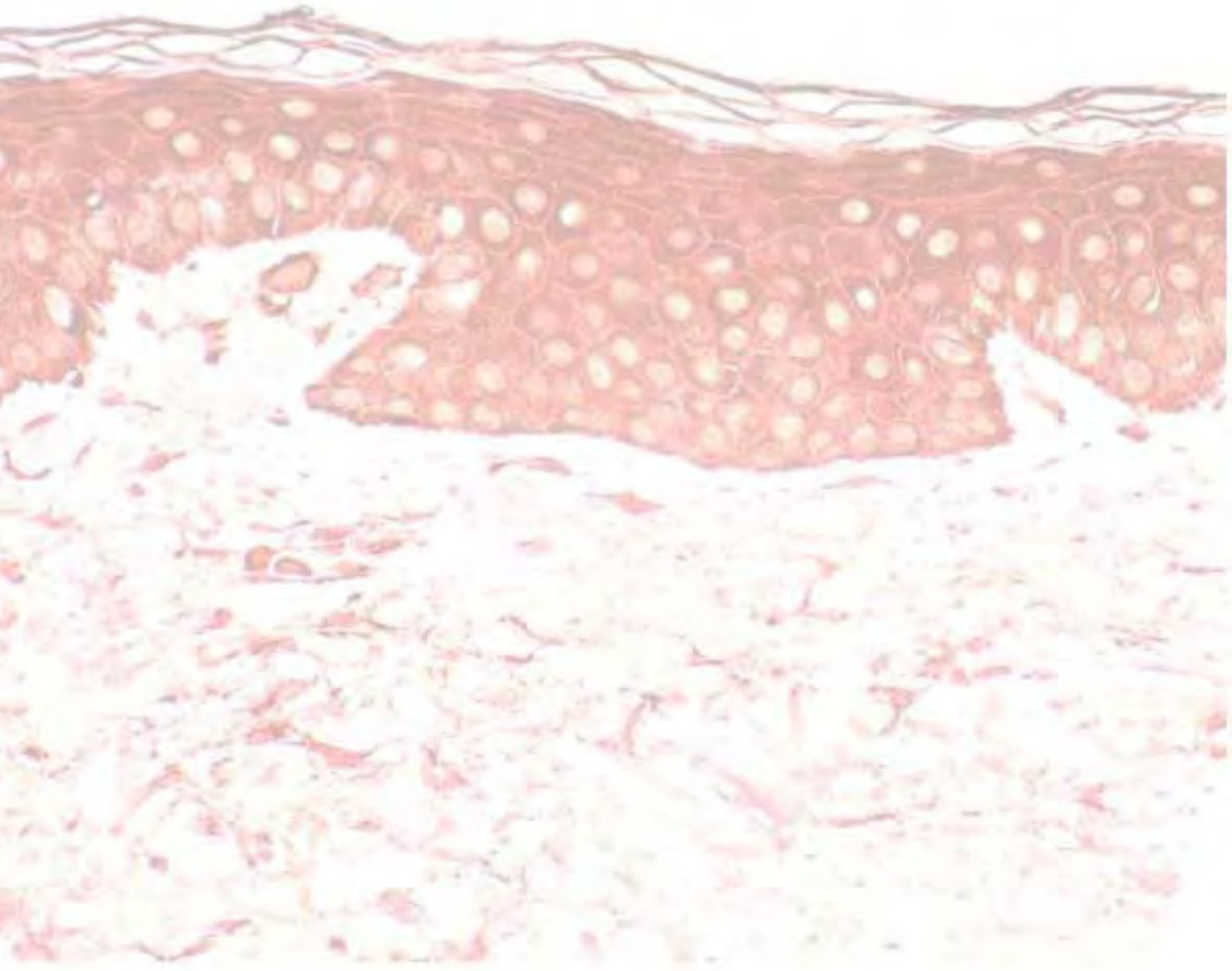
1 Objetivo Geral

Caracterizar morfofuncionalmente a pele com melasma.

2 Objetivos Específicos

- Caracterizar clínica e epidemiologicamente os pacientes portadores de melasma;
- Caracterizar histopatologicamente a pele acometida por melasma comparando-a com a pele adjacente sã;
- Avaliar semi-quantitativamente os melanócitos e a produção de melanina por essas células, na pele com melasma e na pele sã;
- Caracterizar morfologicamente e ultra-estruturalmente os melanócitos, bem como identificar sinais de alteração funcional dessas células na pele com melasma;
- Comparar, empregando análise digital de imagem, a expressão de α-MSH e MC1-R na epiderme com melasma e sã.
- Quantificar relativamente a expressão do RNAm de MC1-R na pele com melasma, comparando com pele sã perilesional.

Capítulo III - Manuscrito 1



Texto em português segundo as normas da revista Anais Brasileiros de Dermatologia.

Título: Melasma: Estudo clínico e epidemiológico.

Title: Melasma: Clinic and epidemiologic study.

Autores:
Luciane Donida Bartoli Miot
Dermatologista do Departamento de Dermatologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Hélio Amante Miot
Professor Assistente Doutor do Departamento de Dermatologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Márcia Guimarães da Silva
Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Mariângela Esther Alencar Marques
Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Endereço para Correspondência:
Luciane Donida Bartoli Miot
Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp, S/N.
Campus da Unesp, Rubião Jr.
18618-000 – Botucatu – SP
E-mail: lucianemiot@fmb.unesp.br
FONE/FAX: 14 3882 4922

Trabalho realizado no ambulatório do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp.

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse relacionado à divulgação dos resultados.

A pesquisa obteve apoio financeiro da FAPESP (Processo 04/03135-5).

Resumo

Fundamentos: Melasma é hipermelanose adquirida freqüente, crônica, que afeta áreas fotoexpostas e causa importante dano estético. Há poucos estudos epidemiológicos na literatura descrevendo esses pacientes.

Objetivo: Caracterizar clínica e epidemiologicamente pacientes brasileiros portadores de melasma atendidos em serviço universitário.

Casuística: Inquérito das principais características de portadores de melasma atendidos no ambulatório de dermatologia da FMB-Unesp entre janeiro 2005 a dezembro de 2007, empregando questionário padronizado. As variáveis foram ajustadas por modelos de regressão multivariados.

Resultados: Avaliaram-se 137 pacientes, sendo 95,6% do sexo feminino, fototipos III (34,1%), IV (34,8%) e V (20,5%) foram os mais freqüentes, idade média do início da doença 28,1 anos e história familiar de melasma em 55,2%. Gestação (38,5%), exposição solar (21,9%) e uso de anticoncepcional oral (13,2%) foram os fatores desencadeantes mais relatados. As topografias faciais mais observadas foram zigomática (79,9%), labial superior (46,3%) e frontal (41,0%). Doença desencadeada por gestação se associou com idade de início mais precoce ($p<0,01$) e positividade de história familiar se associou com duração mais prolongada ($p<0,01$).

Conclusão: A alta prevalência em adultos do sexo feminino, relação com estímulos hormonais e influência genética familiar foram características nessa população.

Palavras-chave: Epidemiologia descritiva, Melanose, Melasma

Abstract

Background: Melasma is a common chronic acquired hypermelanosis, that affects photoexposed areas and causes major aesthetic damage. There are few epidemiologic studies concerned these patients published in medical literature.

Objective: To characterize clinic and epidemiologic data regarding Brazilian patients affected with melasma.

Methods: Patients with melasma attended at dermatologic clinic from São Paulo State University in a period ranging 2005 to 2007 were inquired using a standardized questionnaire. Independent variables were adjusted by multivariate regression models.

Results: There were evaluated 137 patients, which 95,6% were females, skin phototypes III (34,1%), IV (34,8%) and V (20,5%) were more frequent, disease starting mean age was 28,1 years and family history of melasma was identified in 55,2%. Pregnancy (38,5%), sun exposure (21,9%) and contraceptive pills (13,2%) were most related initiating factors. Preferred facial topographies were zigomatic (79,9%), labial (46,3%) and frontal (41,0%). Pregnancy induced melasmas have been associated to premature disease onset ($p<0,01$), as well as familiar history has been associated to longer disease duration ($p<0,01$).

Conclusions: High prevalence in female adults, the relationship to hormonal stimulus and familiar genetic influence were characteristic in this population.

Key-words: Descriptive epidemiology, Melanosis, Melasma

Introdução

Melasma é uma dermatose adquirida freqüente, crônica, refratária à terapêutica, com importante envolvimento estético e impacto na qualidade de vida. Afeta principalmente mulheres adultas em idade fértil, de todas as etnias, e se caracteriza por máculas hipercrômicas homogêneas, simétricas e irregulares, principalmente na face e áreas fotoexpostas.[1-8]

Histopatologicamente, observa-se uma hiperatividade melanocítica clonal localizada, com aumento do número e maturidade dos melanossomas, hiperpigmentação melânica de todas as camadas da epiderme e elastose solar, porém, grande parte de sua fisiopatogenia permanece desconhecida.[2,9]

Clinicamente, há várias classificações para a distribuição topográfica das lesões, a mais empregada divide os melasmas em: centro-faciais e malares. Alguns autores acrescentam um terceiro padrão menos freqüente, chamado mandibular ou adotam classificações mais objetivas como: melasmas centrais, periféricos e mistos.[1,3,8,10]

Inúmeros fatores estão envolvidos na etiologia da doença, porém nenhum deles pode ser responsabilizado isoladamente pelo seu desenvolvimento. Gravidez, terapias hormonais e contraceptivos orais, cosméticos, drogas fototóxicas, endocrinopatias, estresses emocionais e medicações anti-convulsivas são elementos referidos pela literatura, entretanto, predisposição genética e exposição às radiações solares, são considerados os fatores mais importantes para seu desenvolvimento.[1,4,6,8,11,12]

No último censo dermatológico brasileiro, os transtornos da pigmentação figuraram como o terceiro principal grupo de dermatoses e representaram a segunda queixa entre pacientes femininas, totalizando respectivamente 8,8% e 11,6% dos diagnósticos.[13] Em estudos epidemiológicos de base populacional em grupos especiais, como gestantes, a prevalência da doença pode ser maior que 15,0%.[14-16]

Entretanto, há poucos estudos epidemiológicos descritivos na literatura que abordem o melasma, ou que estudem as relações entre as variáveis clínicas e demográficas de seus pacientes, ou de subgrupos. Neste trabalho se avaliam as principais características clínicas e epidemiológicas de pacientes portadores de melasma, provenientes de ambulatório de hospital universitário.

Casuística e Métodos

Foi conduzido um estudo epidemiológico descritivo envolvendo inquérito das características de pacientes portadores de melasma, voluntários, adultos, sem restrição por sexo ou fototipo, atendidos no ambulatório de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2008.

Todos os pacientes responderam a um questionário padronizado (Anexo I) de informações clínicas e epidemiológicas relacionadas à doença e foi solicitada dosagem de hormônio tireoestimulante (TSH) e cortisol basal. O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo II).

Em cada paciente o diagnóstico de melasma foi determinado clinicamente por um médico especialista em dermatologia. Somente foram incluídos no estudo pacientes concordantes e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III).

Os dados foram tabulados em planilha MS Excel 2003 e analisados estatisticamente pelo software Bioestat 4.0. Gráficos e análise multivariada foram desenvolvidos no software SPSS 15.0.[17,18]

Variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Lilliefors. Distribuições das amostras paramétricas foram representadas pela média aritmética e desvio-padrão (dp), amostras não-paramétricas foram representadas pela mediana e desvio interquartílico (diq).

Variáveis categóricas foram representadas como proporções e analisadas pelo teste Qui-quadrado. Na análise multivariada, variáveis dependentes categóricas foram ajustadas pelas demais co-variáveis por um modelo hierárquico de regressão logística múltipla condicional. Associação entre as variáveis foi estimada pelo *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Na análise multivariada de variáveis dependentes contínuas, o ajuste das co-variáveis foi realizado por um modelo linear generalizado (ANCOVA), empregando o algoritmo estimador robusto. Os modelos de regressão multivariados foram reduzidos segundo a seleção de variáveis empregando como critério de inclusão valor de $p<0,2$ para cada nível hierárquico (Figura 1).[19,20] Para todos os testes foi adotado nível de significância de 5%, com distribuição de probabilidade bicaudal.

Nível Hierárquico	Tipo de Variável	Variáveis incluídas
1	Variáveis biológicas e constitucionais	Sexo, idade de surgimento da doença, fototipo, história familiar de melasma, duração da doença
2	Variáveis de exposição e comportamentais	Moradia no litoral, moradia rural, uso atual de anticoncepcional, uso atual de filtro solar, tabagismo atual, início desencadeado por gestação, início desencadeado por exposição solar,início desencadeado por anticoncepcional oral, início desencadeado por estresse, início desencadeado por reposição hormonal
3	Lesões cutâneas	Lesões: parotídeas, zigomáticas, temporais, frontais, glabelares, mandibulares, labiais, mentonianas, nasais, cervicais, membros superiores, colo; tipo clínico, número total de lesões

Figura 1. Modelo hierárquico estruturado em níveis.

Resultados

Foram incluídos no estudo 137 pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2008, e seus principais dados clínicos e epidemiológicos estão descritos na Tabela 1.

Observou-se franca predominância do sexo feminino (95,6%) ($p<0,01$), idades compreendidas entre a terceira e sexta décadas (Figura 2) e surgimento da doença na idade adulta (menacme) (Figura 3). Não foram observados pacientes de origem oriental na amostra estudada.

Os fototipos prevalentes foram os intermediários (figura 4), a história familiar foi expressiva (55,2%), assim como relato de residir em zona rural (56,2%).

Em relação aos fatores referidos como desencadeantes do melasma, 38,5% apontaram gestação, 21,9% exposição solar e 13,2% uso de contraceptivo oral.

Formas clínicas mistas foram as mais freqüentes, seguidas pelas formas exclusivamente centrais. A topografia facial mais acometida foi a região zigomática (79,9%), seguida da labial superior (46,3%), frontal (41,0%) e parotídea (39,6%). Houve acometimento de mais que duas topografias faciais na maioria dos pacientes.

As alterações hormonais do TSH e cortisol foram compatíveis com as encontradas na população adulta feminina.

Pacientes com história familiar de melasma demonstraram associação positiva com o sexo masculino, presença de lesões mandibulares e maior persistência da doença; além de associação inversa com início da doença induzido por anticoncepcionais, uso atual de fotoprotetor e lesões parotídeas (Tabela 2).

Não houve diferença na freqüência da distribuição topográfica de lesões faciais de melasma entre os pacientes com doença desencadeada por gestação, anticoncepcional ou fotoexposição ($p>0,1$).

Pacientes femininas, com o melasma desencadeado pela gestação, apresentaram associação com idade de surgimento da doença mais precoce e acometimento de lábios superiores; por outro lado, houve associação inversa com uso atual de fotoprotetor, lesões zigomáticas e frontais (Tabela 3).

Tabela 1. Dados Clínicos e epidemiológicos dos pacientes portadores de melasma.

		N	%	IC 95%		
Sexo	Feminino	131	95.6	92.2	a	99.1
	Masculino	6	4.4	0.9	a	7.8
Fototipo	I	-	-			
	II	11	8.3	3.6	a	13.1
	III	45	34.1	25.9	a	42.3
	IV	46	34.8	26.6	a	43.1
	V	27	20.5	13.5	a	27.4
	VI	3	2.3	0.0	a	4.8
História familiar de melasma		74	55.2	46.7	a	63.7
Moradia no litoral		6	4.4	0.9	a	7.8
Moradia rural		77	56.2	47.8	a	64.6
Tabagismo		44	32.6	24.6	a	40.6
Uso de anticoncepcional oral		42	33.1	24.8	a	41.3
Uso de filtro solar		105	55.3	48.1	a	62.4
Fatores desencadeantes		113	82.5	76.1	a	88.9
	Gestação*	50	38.5	30.0	a	46.9
	Exposição solar	30	21.9	14.9	a	28.9
	ACO**	17	13.2	7.3	a	19.1
	Estresse psicológico	10	7.4	2.9	a	11.8
	Cosméticos	4	2.9	0.1	a	5.8
	Terapia de Reposição Hormonal**	2	1.5	0.0	a	3.7
Topografia acometida	Zigomática	107	79.9	73.0	a	86.7
	Labial superior	62	46.3	37.7	a	54.8
	Frontal	55	41.0	32.6	a	49.5
	Parotídea	53	39.6	31.2	a	47.9
	Nasal	47	35.1	26.9	a	43.2
	Mentoniana	46	34.3	26.2	a	42.4
	Mandibular	31	23.1	15.9	a	30.3
	Glabelar	30	22.4	15.3	a	29.5
	Temporal	27	20.1	13.3	a	27.0
	Colo	14	10.4	5.2	a	15.7
	MMSS	6	4.5	0.9	a	8.0
	Cervical	5	3.7	0.5	a	7.0
Nº de topografias acometidas (mediana ± iqd)		3	2	2	a	4
Classificação clínica***	Central	60	44.8	36.3	a	53.3
	Periférico	6	4.5	0.9	a	8.0
	Misto	68	50.7	42.2	a	59.3
TSH alterado		17	21.8	12.5	a	31.1
Cortisol basal alterado		4	7.4	0.3	a	14.6
Idade (mediana ± diq anos)		41	18	15.7	a	72.7
Idade do início da doença (média ± dp anos)		28.1	8.3	11.8	a	44.5
Duração da doença (média ± dp anos)		17.3	13.9	0.0	a	44.7

* Entre as mulheres que gestaram; ** Entre as mulheres, *** Formas faciais

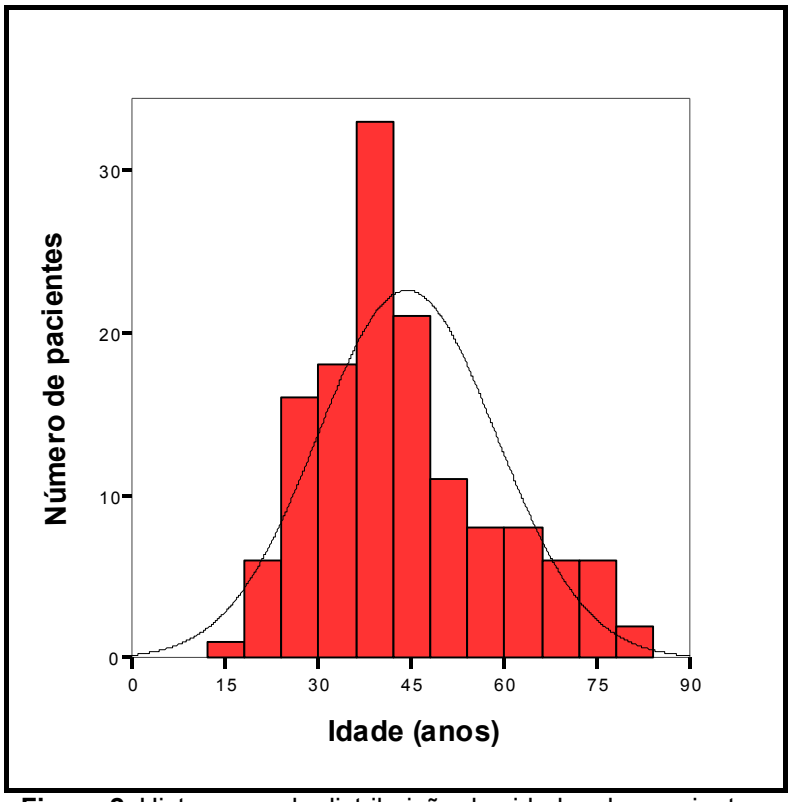


Figura 2. Histograma da distribuição das idades dos pacientes.

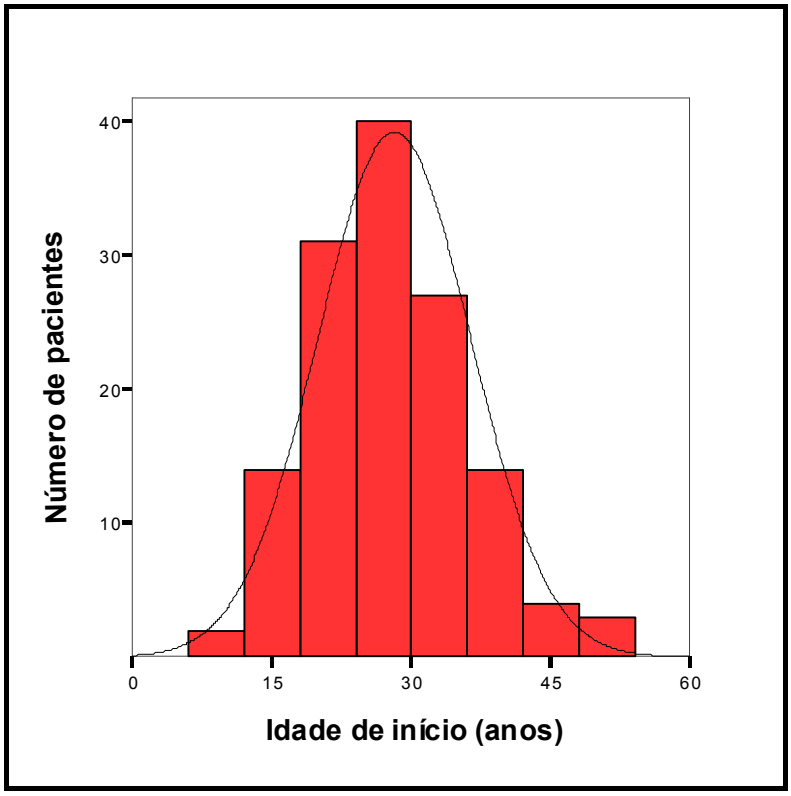


Figura 3. Histograma da distribuição das idades de início do melasma.

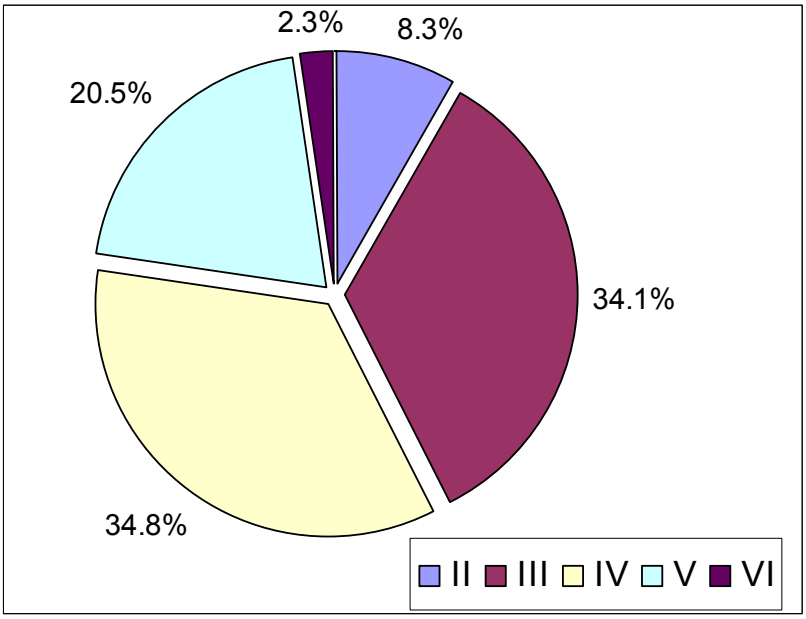


Figura 4. Distribuição dos fototipos dos pacientes portadores de melasma.

Tabela 2. Modelo logístico multivariado reduzido da história familiar de melasma.

	p	Odds Ratio	IC 95%		
Sexo Masculino	0.007	7.131	1.706	a	29.813
Duração da doença	0.003	1.048	1.016	a	1.081
Início associado ao anticoncepcional	0.012	0.213	0.063	a	0.715
Uso atual de fotoprotetor	0.047	0.381	0.147	a	0.986
Lesões parotídeas	0.034	0.372	0.149	a	0.928
Lesões mandibulares	0.041	3.106	1.049	a	9.195
Lesões mentonianas	0.193	0.579	0.254	a	1.319
Lesões no colo	0.208	0.423	0.110	a	1.616

N=137, Modelo completo p<0,01, Intercepto não significativo p>0,1

Melasmas induzidos pela exposição solar se associaram positivamente com a o relato de história familiar e com história de moradia na praia; entretanto, houve associação inversa com a presença de lesões temporais e mandibulares e uso atual de anticoncepcional (Tabela 4).

Os pacientes femininos com doença desencadeada por uso de anticoncepcional associaram-se inversamente à história familiar, uso atual de anticoncepcional, lesões temporais, frontais, mandibulares e nasais, além do número de topografias acometidas (Tabela 5).

Tabela 3. Modelo logístico multivariado reduzido de melasma desencadeado por gestação.

	p	Odds Ratio	IC 95%		
Idade de início	0.000	0.845	0.777	a	0.920
Duração da doença	0.063	1.042	0.998	a	1.089
Uso atual de fotoprotetor	0.029	0.210	0.052	a	0.854
Lesões zigomáticas	0.006	0.093	0.017	a	0.514
Lesões frontais	0.017	0.245	0.077	a	0.775
Lesões glabelares	0.076	3.726	0.873	a	15.893
Lesões nos lábios superiores	0.016	4.486	1.317	a	15.285
Lesões Nasais	0.154	0.443	0.145	a	1.357

Análise dos pacientes que já gestaram (N=109)
Modelo completo p<0,01 , Intercepto significativo p<0,05

Tabela 4. Modelo logístico multivariado reduzido de melasma desencadeado por exposição solar.

	p	Odds Ratio	IC 95%		
História familiar	0.046	3.245	1.021	a	10.313
Duração da doença	0.054	0.951	0.903	a	1.001
Uso atual de anticoncepcional oral	0.006	0.167	0.047	a	0.591
Lesões zigomáticas	0.098	0.232	0.041	a	1.311
Lesões temporais	0.011	0.165	0.041	a	0.666
Lesões mandibulares	0.002	0.053	0.008	a	0.346
Lesões no lábio superior	0.177	0.398	0.104	a	1.516
Número total de lesões	0.053	0.617	0.378	a	1.006
Moradia no litoral	0.010	289.052	3.901	a	>1000.000

N=137, Modelo completo p<0,01, Intercepto não significativo p>0,1

Tabela 5. Modelo logístico multivariado reduzido de melasma desencadeado por anticoncepcional.

	p	Odds Ratio	IC 95%		
História familiar	0.008	0.111	0.022	a	0.556
Duração da doença	0.075	0.945	0.889	a	1.006
Uso atual de anticoncepcional	0.015	0.148	0.032	a	0.689
Lesões zigomáticas	0.050	0.109	0.012	a	1.003
Lesões temporais	0.011	0.107	0.019	a	0.601
Lesões frontais	0.030	0.140	0.024	a	0.825
Lesões mandibulares	0.003	0.021	0.002	a	0.274
Lesões nasais	0.035	0.139	0.022	a	0.867
Número de topografias acometidas	0.003	0.266	0.110	a	0.639

Análise dos pacientes do sexo feminino (N=131)
Modelo completo p<0,01 , Intercepto significativo p<0,05

Quando considerado o início mais tardio da doença, houve correlação positiva com o sexo feminino, fototipos mais elevados, morar no litoral, lesões nos membros superiores, doença desencadeada por terapia de reposição hormonal; por outro

lado, doença desencadeada por gestação, uso atual de anticoncepcional oral e lesões cervicais e temporais se relacionaram ao início mais precoce do melasma (Tabela 6).

Tabela 6. Modelo de co-variância reduzido e ajustado da idade de início do melasma.

	p	Estimador β
Sexo Feminino	0.026	7.053
Fototipo	0.010	1.835
Duração da doença	0.058	-0.079
Moradia no litoral	0.000	6.289
Início desencadeado por gestação	0.000	-5.290
Início desencadeado por terapia de reposição hormonal	0.031	9.045
Uso atual de anticoncepcional oral	0.019	-2.928
Lesões zigomáticas	0.676	0.678
Lesões temporais	0.034	-3.253
Lesões cervicais	0.000	-6.972
Lesões nos membros superiores	0.001	8.706
Número total de lesões	0.463	0.259

N=137, Modelo completo p<0,01 , Intercepto significativo p<0,01

Ainda, a contagem do número total de topografias acometidas se correlacionou positivamente com o início desencadeado por gestação e com formas mistas de melasma; entretanto, correlacionou-se inversamente com as formas periféricas (Tabela 7).

Tabela 7. Modelo de co-variância reduzido e ajustado do número de topografias afetadas.

	p	Estimador β
Início desencadeado por gestação	0.000	0.563
Início desencadeado por estresse	0.208	0.808
Tipo Misto	0.000	1.526
Tipo Periférico	0.000	-1. 002
Fototipo	0.402	0.100

N=137, Modelo completo p<0,01 , Intercepto significativo p<0,05

Discussão

Apesar da considerável freqüência do melasma entre os pacientes dermatológicos, há certa escassez de estudos com amostras representativas na sua epidemiologia descritiva, além disso, as características das populações acometidas podem diferir de acordo com aspectos genéticos e ambientais.[8] Notadamente, orientais, latinos e gestantes são os grupos melhor estudados, já que a doença raramente acomete pacientes de fototipos mais claros e apresenta início ou pioras freqüentes na gestação.[2,3,15,21] No entanto, a alta prevalência da doença em afro-descendentes no Brasil e nos Estados Unidos justificaria que o melasma fosse estudado também nessa população.[21] Estudos epidemiológicos de base ambulatorial não só caracterizam populações regionais, mas também fornecem dados analíticos para a formulação e comprovação de hipóteses na história natural da doença, ou no estudo de grupos específicos.[22-24]

Várias séries de casos, em diferentes etnias, destacam o acometimento feminino (9:1) durante a menacme, como predominante nessa entidade.[2,6,8,25] Os raros relatos observados em crianças andinas fortalecem o perfil adulto da doença e valorizam a fotoexposição como fator de risco.[21] Em nosso estudo, a ocorrência de mais de 95% de pacientes femininas e com início da doença entre a segunda e quinta décadas corroboram os achados da literatura e sugerem uma possível relação hormonal envolvida na fisiopatogênese.[26-28]

Sacre et al.[29] investigando o melasma idiopático, concluiu que as reservas tireotrófica, prolactínica e gonadotrófica apresentaram-se normais nesses pacientes. No presente trabalho, os níveis normais de TSH e cortisol não os indicaram como fatores endócrinos envolvidos, tendo em vista que as alterações encontradas foram semelhantes às freqüências de doença subclínica na população adulta feminina.[30]

Esteróides sexuais exógenos, como a terapia de reposição hormonal da menopausa, são apontados como desencadeadores de melasma, inclusive, responsáveis por aqueles mais tardios, casos masculinos e de topografia extra-facial.[4,6,24,31-34]

Contraceptivos orais e gestação são classicamente referidos como desencadeadores da doença, fortalecendo a hipótese de origem endócrina.[35] Ao contrário do que ocorre na gravidez, o melasma induzido por anovulatórios não tende a involuir posteriormente à suspensão do medicamento e, entre as pacientes

que o apresentaram pelos contraceptivos, 87% também o tinham manifestado em gestações anteriores.[8,21] Neste trabalho, melasmas induzidos pela gestação iniciaram mais precocemente, enquanto os induzidos por anticoncepcional oral persistiram por menos tempo e acometeram um menor número de topografias.

Os efeitos dos estrogênios agindo diretamente na melanogênese têm sido relatados por diversos autores.[24,36,37] Esses elementos conduzem uma hipótese de que os melanócitos das lesões de melasma possam ser mais susceptíveis aos hormônios sexuais esteróides. A gestação e o uso de contraceptivos orais foram fatores desencadeantes da doença em mais de 50% dos casos femininos no presente estudo, porém, esses fatores não explicam a totalidade dos eventos, levando a se intuir que elementos variados estejam envolvidos, como já é proposto.[10,35,36]

O acometimento de familiares de primeiro grau dos pacientes com melasma ocorre em mais de 20 a 30% dos casos, sugerindo importância da predisposição genética à doença.[3,21,38-40] No presente estudo, mais de metade dos pacientes referiram história familiar de melasma, entretanto, o viés de memória desses dados precisa ser cuidadosamente interpretado. Pacientes com história familiar positiva apresentaram melasma com duração mais prolongada, o que fortalece a existência de verdadeira susceptibilidade familiar, interferindo na história natural da doença.

Observou-se ainda, maior ocorrência de melasma em fototipos intermediários, como III, IV e V. A raridade de melasmas em fototipos extremos como I e VI sugere uma possível estabilidade do sistema de pigmentação desses indivíduos. Por um lado, os fototipos I apresentam dificuldade de produção de eumelanina frente à exposição à radiação ultravioleta e predominam os melanossomas tipos III nos ceratinócitos. Por outro lado, os fototipos VI já apresentam os melanossomas mais maduros dentro dos ceratinócitos e a reação à exposição solar resulta em franca eumelanogênese. Esses elementos sugerem que, nas áreas acometidas por melasma, a melanogênese intensa, atividade citocrínica mais eficiente e transporte de melanossomas mais maduros e com uma maior proporção de eumelanina, reproduziriam um fototipo mais elevado, suportando a hipótese de uma alteração localizada na unidade epidérmico-melânica dos pacientes com melasma. O que favorece esse argumento é a ocorrência de melasma mais freqüentemente citada entre fenótipos latinos e orientais, em contraposição aos caucasianos e negróides.[2,25,41-43]

A exposição direta à radiação ultravioleta representa o principal fator envolvido nas manifestações clínicas do melasma.[6,8] Isso pôde ser notado também nos pacientes desse estudo, quer pelo acometimento facial predominante em áreas centrais da face, quer pelo fator desencadeante relatado por mais de 20% das pacientes. Outro estudo brasileiro também observou a predominância de lesões clínicas de melasma centro-faciais, corroborando nossos achados.[44] A composição basicamente rural da população estudada dificulta a interpretação dessa variável como um indicador de exposição solar, porém, a alta associação dos melasmas desencadeados após exposição solar e a moradia no litoral reforçam esse argumento.

A classificação clínica do melasma é um tema que deve ser melhor estudado. A divisão entre dérmico e epidérmico, mesmo subsidiada pelo exame a luz de Wood, não encontrou subsídios histopatológicos, apesar de se correlacionar com a resistência à terapêutica.[2,8,44,45] A categorização em facial e extra-facial é simples, mas reducionista, e não privilegia a multiplicidade de combinações do acometimento da face, ou de associações. A denominação centro-facial, malar e mandibular, não considera as formas periféricas e mistas.[3,6,26] Nosso estudo identificou predominância de lesões mistas, sendo as topografias centro-faciais as mais freqüentes. Uma vez que não é adequada precisão das informações remotas sobre fotoexposição e fotoproteção, a exclusividade do acometimento de áreas fotoexpostas se torna o indício mais consistente da dependência da exposição solar no melasma.

A exploração das relações entre as variáveis clínicas e epidemiológicas do melasma favorece a identificação de subgrupos com características peculiares, como as formas extra-faciais do melasma, que apresentam aspectos intrigantes referentes ao seu comportamento e à população afetada. Em nosso trabalho, o acometimento dos membros superiores se relacionou com surgimento tardio da doença.[33] As formas mandibulares se associaram fortemente aos melasmas com história familiar positiva e as formas labiais, com os melasmas gestacionais. Novos estudos comparativos de base populacional devem ser conduzidos para a elucidação dessas particularidades.

Conclusões

A alta prevalência feminina adulta, a relação com estímulos hormonais e a influência genética familiar observadas podem contribuir na elaboração de novas hipóteses a serem testadas para o esclarecimento de aspectos fisiopatológicos, terapêuticos e história natural da doença.

Referências Bibliográficas:

1 Mosher DB FT, Ortonne JP,Hori Y. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 936-44.

2 Kang WH, Yoon KH, Lee ES et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002; 146: 228-37.

3 Sanchez NP, Pathak MA, Sato S et al. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 698-710.

4 Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1998; 139: 932.

5 Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int J Dermatol* 1998; 37: 897-903.

6 Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1453-7.

7 Guevara IL, Pandya AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and a fluorinated steroid. *Int J Dermatol* 2001; 40: 212-5.

8 Ponzio HAS. Contribuição a classificação clínica e histopatológica dos melasmas. . In, Vol. Tese de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1995: 157.

9 Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 96-101.

10 Nicolaidou E, Antoniou C, Katsambas AD. Origin, clinical presentation, and diagnosis of facial hypermelanoses. *Dermatol Clin* 2007; 25: 321-6.

11 Duarte I, Campos Lage AC. Frequency of dermatoses associated with cosmetics. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 211-3.

12 Wolf R, Wolf D, Tamir A et al. Melasma: a mask of stress. *Br J Dermatol* 1991; 125: 192-3.

13 SBD. Censo Dermatológico da SBD. In, Vol. 1. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2006: 15.

14 Costin GE, Birlea SA. What is the mechanism for melasma that so commonly accompanies human pregnancy? *IUBMB Life* 2006; 58: 55-7.

15 Moin A, Jabery Z, Fallah N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy. *Int J Dermatol* 2006; 45: 285-8.

16 Sodhi VK, Sausker WF. Dermatoses of pregnancy. *Am Fam Physician* 1988; 37: 131-8.

17 Mushquash C, O'Connor BP. SPSS and SAS programs for generalizability theory analyses. *Behav Res Methods* 2006; 38: 542-7.

18 Ayres M, Ayres Jr M, Ayres D et al. *Bioestat 4.0 - Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* , Vol. 1. Belém-PA: Sociedade Civil Mamirauá e MCT – CNPq. , 2004.

19 Rocha FP, Menezes AMB, Almeida Jr. HL et al. Marcadores e fatores de risco para queratoses actínicas e carcinomas basocelulares: um estudo de caso-controle. *An Bras Dermatol* 2004; 79: 441-54.

20 Bagley SC, White H, Golomb BA. Logistic regression in the medical literature: standards for use and reporting, with particular attention to one medical domain. *J Clin Epidemiol* 2001; 54: 979-85.

21 Scheinfeld NS. Melasma. *Skinmed* 2007; 6: 35-7.

22 Vazquez M, Maldonado H, Benmaman C et al. Melasma in men. A clinical and histologic study. *Int J Dermatol* 1988; 27: 25-7.

23 Sarkar R, Jain RK, Puri P. Melasma in Indian males. *Dermatol Surg* 2003; 29: 204.

24 Sialy R, Hassan I, Kaur I et al. Melasma in men: a hormonal profile. *J Dermatol* 2000; 27: 64-5.

25 Dominguez AR, Balkrishnan R, Ellzey AR et al. Melasma in Latina patients: cross-cultural adaptation and validation of a quality-of-life questionnaire in Spanish language. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 59-66.

26 Victor FC, Gelber J, Rao B. Melasma: a review. *J Cutan Med Surg* 2004; 8: 97-102.

27 Perez M, Sanchez JL, Aguilo F. Endocrinologic profile of patients with idiopathic melasma. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 543-5.

28 Lutfi RJ, Fridmanis M, Misiunas AL et al. Association of melasma with thyroid autoimmunity and other thyroidal abnormalities and their relationship to the origin of the melasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 28-31.

29 Sacre RC, Fernandes NC, Vaisman M et al. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. *An Bras Dermatol* 1996; 71: 195-8.

30 Wilson GR, Curry RW, Jr. Subclinical thyroid disease. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1517-24.

31 Burkhart CG. Chloasma in a man due to oral hormone replacement. *Skinmed* 2006; 5: 46-7.

32 O'Brien TJ, Dyall-Smith D, Hall AP. Melasma of the forearms. *Australas J Dermatol* 1997; 38: 35-7.

33 Varma S, Roberts DL. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1999; 141: 592.

34 Hammer CJ. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *Northwest Med* 1968; 67: 251-4.

35 Resnik S. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *Jama* 1967; 199: 601-5.

36 Ranson M, Posen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones: in vitro studies with 1 alpha-25, dihydroxyvitamin D3, alpha-melanocyte stimulating hormone, and beta-estradiol. *J Invest Dermatol* 1988; 91: 593-8.

37 Jee SH, Lee SY, Chiu HC et al. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1407-12.

38 Hughes BR. Melasma occurring in twin sisters. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 841.

39 Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2007; 39: 1443-52.

40 Branicki W, Brudnik U, Kupiec T et al. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci* 2007; 52: 349-54.

41 Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP et al. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 936-44.

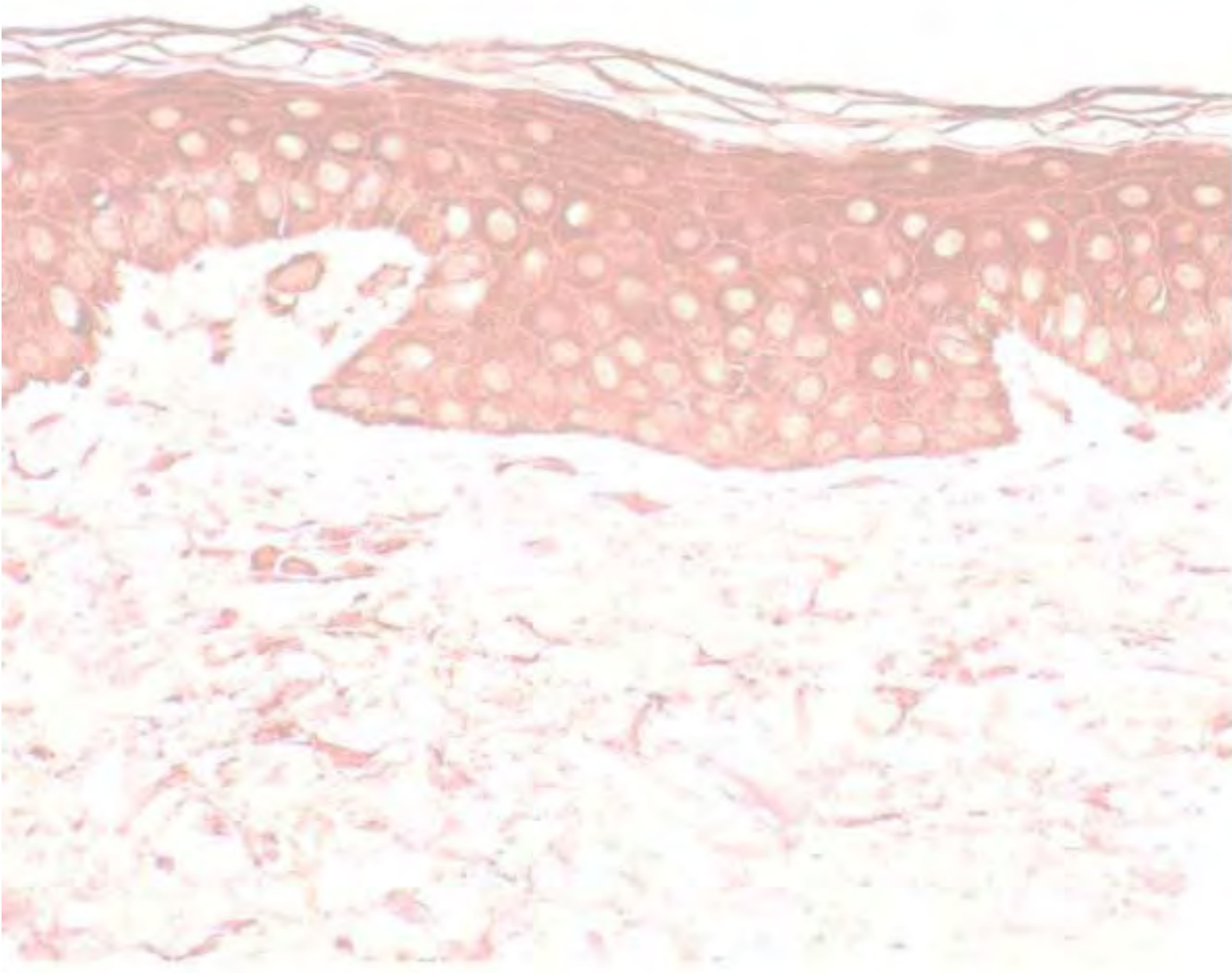
42 Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol* 2003; **149**: 572-7.

43 Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol* 2006; **156 Suppl 1**: 13-20.

44 Ponzio HAS, Cruz MF. Acurácia do exame sob a lâmpada de Wood na classificação dos cloasmas. *An Bras Dermatol* 1993; **68**: 325-8.

45 Miot LDB, Miot HA, Silva MG et al. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol* 2007; **82**: 529-64.

Capítulo IV - Manuscrito 2



Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma*

Morphological and functional comparative study of melanocytes in melasma lesions *

Luciane Donida Bartoli Miot [1]
Hélio Amante Miot [2]
Márcia Guimarães da Silva [3]
Mariângela Esther Alencar Marques [4]

Resumo: FUNDAMENTOS - Melasma é hipermelanose comum caracterizada por máculas acastanhadas em áreas fotoexpostas, cuja fisiopatogenia não é totalmente esclarecida.
OBJETIVOS - Caracterizar e comparar morfologica e funcionalmente os melanócitos da epiderme sã com os da pele afetada por melasma.
MÉTODOS - Avaliaram-se 12 pacientes portadores de melasma facial, sendo realizadas biópsias da pele lesada e pele sã adjacente. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina, Fontana-Masson, marcados pelo Melan-A e submetidos à microscopia eletrônica. A quantificação epidérmica de melanina e melanócitos foi estimada a partir de análise citomorfométrica digital.
RESULTADOS - Todas as pacientes eram mulheres com média de idade 41,3 ±2,8 anos. Ao Fontana-Masson evidenciou-se importante aumento da melanina epidérmica na pele lesada em relação à pele sã. A marcação pelo Melan-A demonstrou melanócitos maiores com dendritos proeminentes na pele lesada. Observou-se maior densidade de melanina epidérmica na pele lesada, e a análise digital do número de melanócitos da epiderme não demonstrou diferença significativa entre pele lesada e sã. À microscopia eletrônica, observaram-se número aumentado de melanossomas maduros nos ceratinócitos e melanócitos com organelas citoplasmáticas proeminentes na pele lesada.
CONCLUSÕES - Melanogênese aumentada na epiderme com melasma em relação à epiderme normal adjacente.
Palavras-chave: Imunoistoquímica; Melanócitos; Melanose; Melanossomas; Microscopia eletrônica

Abstract: *BACKGROUND - Melasma is a common hypermelanosis characterized by symmetric brownish macules on photoexposed areas, most frequently on the face of women. Its pathophysiology is still unknown.*
OBJECTIVES - To morphologically and functionally characterize and compare melanocytes of normal skin and of melasma.
METHODS - Twelve patients with facial melasma were assessed and biopsies of lesions and adjacent healthy skin were performed. The slices were stained with hematoxylin-eosin and Fontana-Masson, immunohistochemically marked for Melan-A and evaluated by electronic microscopy. Quantification of epidermal melanin and melanocytes was estimated by digital cytomorphometric analysis.
RESULTS - All patients were female, mean age of 41.3±2.8 years. The Fontana-Masson staining showed an important increase in epidermal melanin as compared to normal skin. The Melan-A staining demonstrated larger and intensely marked melanocytes and more prominent dendrites in the damaged skin. Greater epidermal melanin density was observed in melasma lesions and the digital analysis of number of epidermal melanocytes did not show a significant difference between damaged and normal skin. Electronic microscopy analysis revealed an increased number of mature melanosomes in keratinocytes and melanocytes, with marked cytoplasmic organelles in melasma skin.
CONCLUSIONS - Melanogenesis is increased on melasma epidermis as compared to adjacent normal skin.
Keywords: Immunohistochemistry; Melanocytes; Melanosis; Melanosomes; Microscopy, electron

Recebido em 10.11.2006.
Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 01.11.2007.
* Trabalho realizado nos Departamentos de Dermatologia e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / Conflict of interest: None
Suporte financeiro / Financial funding: Fundação de Amparo para Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

[1] Dermatologista do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.
[2] Professor assistente doutor do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.
[3] Professora assistente doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.
[4] Professora assistente doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/Unesp) – Botucatu (SP), Brasil.

©2007 *by* Anais Brasileiros de Dermatologia

INTRODUÇÃO

Melasma é hipermelanose comum, adquirida, simétrica, de contorno irregular, porém com limites nítidos. Caracteriza-se por máculas acastanhadas, de intensidades diferentes, em áreas fotoexpostas, especialmente na face, fronte e têmporas, e mais raramente no nariz, pálpebras e mento.[1-4]

Apesar de ser dermatose diagnosticada clinicamente com facilidade, apresenta cronicidade característica, representada pela refratariedade aos inúmeros tratamentos, e, até o presente, grande parte de seus aspectos fisiopatológicos permanecem desconhecidos.[1, 5]

Melasma deriva do grego *"melas"*, que significa negro, e deve ser preferido em relação ao termo cloasma, que é usado com o mesmo significado, sendo também derivado do grego *"cloazein"*, que significa estar esverdeado.[1]

A idade média de aparecimento varia entre 30 e 55 anos, e o sexo masculino representa apenas 10% dos casos. Entretanto, não há estudos sobre sua real incidência na população ocidental, embora possa acometer ambos os sexos e todas as raças. É mais comum em mulheres adultas em idade fértil, podendo, porém, ter início na pós-menopausa.[3,7]

Clinicamente, podem ser reconhecidos três padrões principais de melasma: centrofacial, malar e mandibular.[1] Alguns autores acrescentam outros padrões menos freqüentes, como mandibular e parotídeo, ou adotam classificações mais objetivas, como melasmas centrais e periféricos. Ponzio e Cruz observaram, em um estudo nacional, 78,7% de melasmas centrais e 21,3% de periféricos.[7,8]

Há inúmeros fatores envolvidos na etiologia da doença, porém nenhum deles pode ser responsabilizado isoladamente: influências genéticas, exposição à radiação ultravioleta, gravidez, menopausa, terapias hormonais, anticoncepcionais orais, cosméticos, drogas fototóxicas, endocrinopatias, fatores emocionais, medicações anticonvulsivantes e outros com valor histórico, mas os principais são predisposição genética e exposição às radiações solares, tendo em vista que as lesões de melasma são mais evidentes durante ou logo após períodos de exposição solar.[2-4, 7,9]

A predisposição genética tem sido sugerida somente por relatos ocasionais de ocorrência familiar. Um fator racial tem sido relatado pela ocorrência comum de melasma nos pacientes de origem hispânica e oriental, principalmente em áreas tropicais.[10] Um estudo identificou história familiar em 21% dos casos avaliados, e todas as pacientes referiram exacerbação pela luz solar e uso de cosméticos.[1]

É curiosa a boa delimitação das lesões de melasma em áreas com estímulo semelhante de radiação solar, bem como sua reincidência nos mesmos locais, poupando áreas adjacentes, sugerindo alteração funcional bem localizada, provavelmente nas unidades epidérmico-melânicas locais.

Há poucos dados de literatura caracterizando histopatologicamente e ultra-estruturalmente o melasma e menos ainda comparando alterações nos melanócitos da pele acometida pela doença e pele sã adjacente.

Esse estudo pretende avaliar morfologica e funcionalmente os melanócitos da epiderme acometida por melasma em comparação aos da pele sã perilesional.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos no estudo 12 pacientes voluntários, esclarecidos e concordantes, com diagnóstico de melasma facial, atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de colagenoses, discrasias sangüíneas, sob uso de medicação anticoagulante, imunossuprimidos, diabéticos, hipertensos graves, gestantes e lactantes.

De cada paciente foram obtidos dois fragmentos de pele lesada e dois de pele sã (*punch* 2mm) respeitando o limite máximo de 2cm entre as amostras de pele normal e de melasma.

Dois fragmentos de pele foram fixados em formalina 10% e processados para o exame histopatológico. As lâminas foram coradas pelo método clássico de hematoxilina-eosina (HE) para análise das alterações histopatológicas gerais e pela coloração de Fontana-Masson para avaliação da melanina.

Para detecção da distribuição dos melanócitos foi realizada reação de imuno-histoquímica, utilizando-se como marcador Melan-A e contracoloração pelo Giemsa.

Os outros dois fragmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica de transmissão.

Os cortes histológicos, submetidos à microscopia de luz, corados pelo Fontana-Masson, foram fotografados sob iluminação padronizada, em aumento de 400x, empregando câmera digital Sony S75, com resolução de 2592x1944, 24bits de profundidade de cor, armazenados em arquivos *JPEG na qualidade "*Fine*".

Empregando o *software* ImageJ 1.34s foram definidas as intensidades de cores que representam a melanina nos cortes, fotografados sob os padrões citados.[11]

Após a normalização do histograma de cores e conversão para 8bits, avaliou-se a densidade de pontos (pixels) com a intensidade da melanina determinada dentre os *pixels* de espaços interfoliculares da epiderme, compreendendo as regiões entre a lâmina basal e a camada granulosa alta (Figura 1).

Os cortes histológicos submetidos à microscopia de luz, marcados pelo Melan-A e corados pelo Giemsa, foram fotografados sob o mesmo protocolo anterior.

Foram definidas as intensidades de cor que

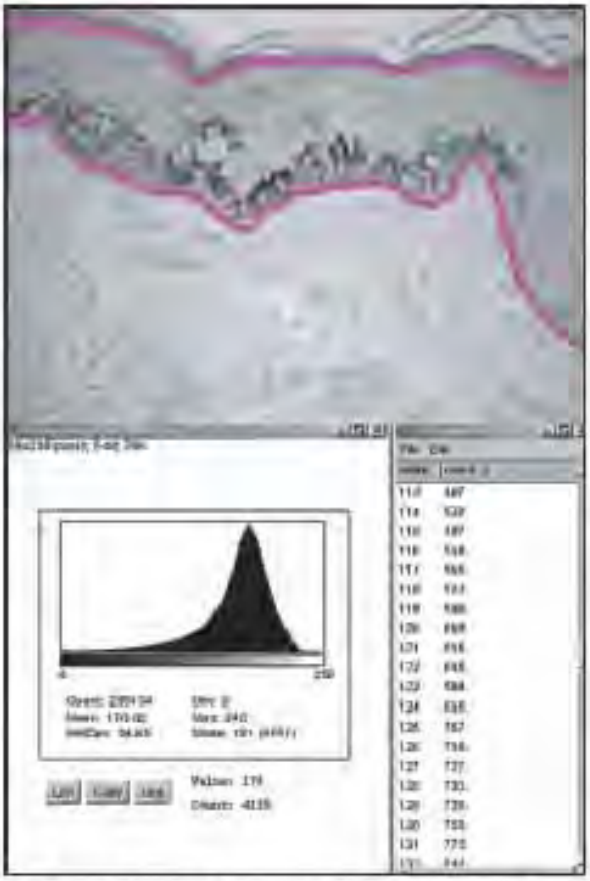


FIGURA 1: Análise da densidade de pixels relacionados à intensidade da melanina na epiderme

representam a melanina e os melanócitos (Melan-A) nos cortes, assim como foi mensurado o tamanho das partículas referentes aos melanócitos.

Após normalização da imagem e conversão para 8bits, foi definida sua binarização a partir dos valores limites de intensidade de cor dos melanócitos e promovida a análise automatizada de partículas, limitando os tamanhos máximos e mínimos para as contagens.

As análises quantitativas de melanina e melanócitos foram realizadas em triplicata para cada paciente.

Os valores médios encontrados para cada amostra foram tabulados e comparados pareadamente (pele sã e lesada) utilizando o teste de Wilcoxon, adotando como significativo o valor de p bicaudal de 0,05.

Os dados foram tabulados em MSExcel 2003® e analisados empregando o software BioEstat 3.0.12.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

RESULTADOS

Todos os 12 pacientes eram do sexo feminino, sendo a idade média (± dp) 41,3 ± 2,8 anos, e a idade de manifestação inicial da doença ocorreu aos 25,3 ± 7,6 anos.

As regiões mais afetadas da face foram: zigomática (82,4%), parotídea (64,7%), frontal (64,7%), mandibular (35,3%) e nasal (35,3%). O fototipo prevalente foi o III (50%) (Gráfico 1).

A história familiar de melasma esteve presente em todos os pacientes, e sete deles (58,3%) identificaram como fator associado ao surgimento da doença a gestação.

De todos os pacientes, oito (66,7%) referiram, em algum momento da vida, domicílio na zona rural.

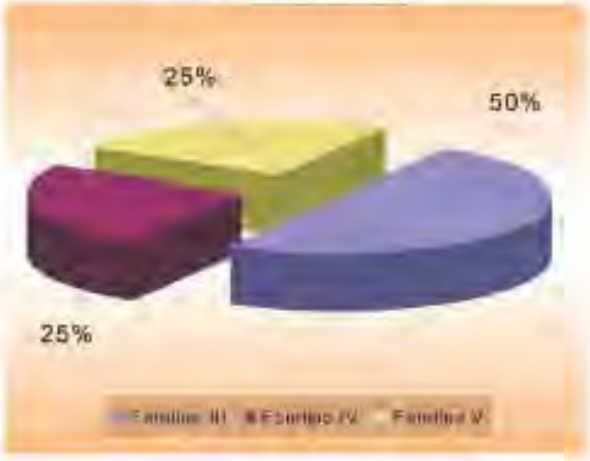
A análise das lâminas coradas pelo HE (Figuras 2A e B) demonstrou aumento variável da melanina epidérmica e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário perivascular, de leve a moderada intensidade, nos casos de melasma em comparação com a pele adjacente normal. Foi observado significativo aumento da elastose na derme papilar nos fragmentos de melasma (Wilcoxon $p<0,01$). Entretanto, nem a presença de melanófagos nem de fibroblastos mostrou-se diferente entre as amostras.

A análise das lâminas coradas pelo Fontana-Masson (Figuras 2C e D) evidenciou importante aumento da melanina epidérmica na pele acometida pelo melasma em relação à pele normal, e a melanina dérmica, por outro lado, não apresentou diferença significativa entre os fragmentos.

Na análise das lâminas marcadas com Melan-A e contracoradas com Giemsa (Figuras 2E e F), notaram-se melanócitos maiores, intensamente marcados e com dendritos mais proeminentes na pele com melasma em comparação com a pele normal.

A análise digital da densidade de melanina da epiderme presente nos cortes de pele corados pelo Fontana-Masson, avaliados à microscopia de luz, demonstrou sig-

GRÁFICO 1: Distribuição das pacientes incluídas no estudo por fototipos de pele



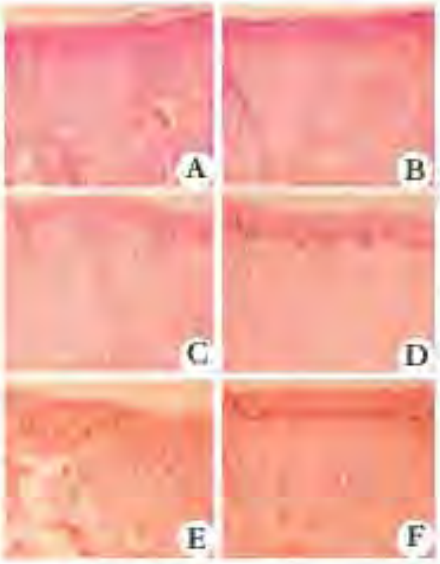


FIGURA 2: A) Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, adjacente à acometida por melasma; B) Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele com melasma, evidenciando a camada basal da epiderme com melanina aumentada e derme com leve infiltrado inflamatório perivascular (HE, 40x); C) Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, adjacente à acometida por melasma; D) Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele com melasma, evidenciando a camada basal da epiderme com melanina aumentada (Fontana-Masson, 40x); E) Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, adjacente à acometida por melasma; F) Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele com melasma, mostrando melanócitos maiores, intensamente marcados e com dendritos mais proeminentes (Melan-A/Giemsa, 40x)

nificativo aumento da quantidade de melanina na pele lesada (Wilcoxon $p<0,01$) (Gráfico 2). A razão média das densidades de melanina entre os fragmentos de pele lesada e sã foi de 1,47, variando de 1,04 a 3,75.

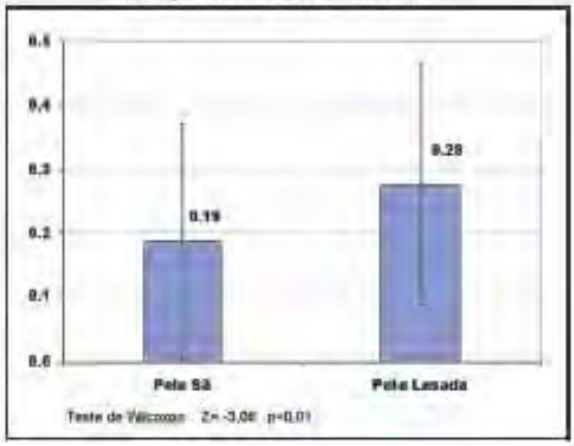
A análise digital do reconhecimento de partículas com intensidade de cor equivalente aos melanócitos da epiderme, presentes nos cortes de pele marcados pelo Melan-A, avaliados à microscopia de luz, não demonstrou diferença significativa entre a pele lesada e sã (Wilcoxon $p>0,05$) (Gráfico 3). Os melanócitos da pele afetada, entretanto, apresentaram tamanho mais pronunciado que nos cortes de pele normal.

A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou número aumentado de melanossomas maduros nos ceratinócitos e melanócitos com organelas citoplasmáticas mais proeminentes na pele com melasma em relação à sã (Figura 3).

DISCUSSÃO

Melasma é uma das dermatoses inestéticas que determinam grande procura nos consultórios privados ou serviços públicos e inflige grande impacto psicossocial nos indivíduos acometidos, os quais muitas

GRÁFICO 2: Distribuição das densidades de melanina na epiderme entre as amostras



vezes, em virtude da insatisfação com a aparência, acabam se privando do convívio social, havendo até casos de suicídio relatados.[15]

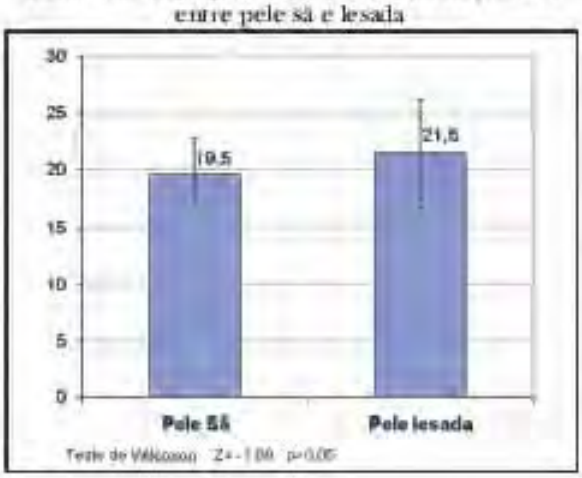
Uma importante pergunta a ser respondida é: como a função dos melanócitos contribui para uma coloração fenotípica localizada? Ou: como a cor da pele geneticamente predeterminada se altera para cor induzida por fatores como luz solar, hormônios, inflamações e outros? Sem dúvida, tais elucidações podem gerar importantes subsídios para esclarecimentos em relação à fisiopatogenia da doença e também para inovações terapêuticas.

Sacre e colaboradores,[9] investigando o melasma idiopático, concluíram que as reservas tireotrófica, prolactínica e gonadotrófica apresentaram-se normais e que, como observaram normofunção ovariana e tireoidiana, não foi possível estabelecer correlação entre os níveis hormonais encontrados e essa forma de melasma.

Estudos comparativos de pele acometida por melasma e pele adjacente normal verificaram que a afecção se caracteriza por hiperpigmentação epidérmica, aumento da quantidade de melanina em todas as camadas epidérmicas, aumento no número de melanossomas e aumento da elastose dérmica.[5, 8, 16]

Achados imuno-histoquímicos sugerem que forte imunorreatividade do hormônio estimulador de melanócitos-α (α-MSH) na pele acometida por melasma é um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento dessa entidade. Por outro lado, a relação entre área fotoexposta e a maior imunorreatividade de α-MSH na pele lesada ainda não foi elucidada. A existência de um caminho sinalizador ainda desconhecido, com aumento de expressão de receptor de melanocortina tipo-1 (MC1-R), que pode desempenhar papel significante nessa maior imunorreatividade de α-MSH deve ser investigado.[16,17]

Gráfico 3: Contagem de melanócitos comparativa entre pele sã e lesada



Há, porém, evidências de forte expressão de antígeno α-MSH nos ceratinócitos de pele acometida por melasma, sugerindo que α-MSH desempenhe papel-chave na hiperpigmentação de pele com melasma.[8,16]

A pele fotoexposta da face contém número significativamente maior de melanócitos epidérmicos que o restante do corpo, e a pele afetada pelo melasma é caracterizada por coloração diferente da pele adjacente, mesmo sendo submetida aos mesmos fatores ambientais.[9]

Dessa forma, a pele sã adjacente ao melasma representa o melhor controle para comparação das possíveis alterações fisiopatológicas locais. Por essa razão, essa metodologia foi empregada nos demais estudos controlados.[8,10,16]

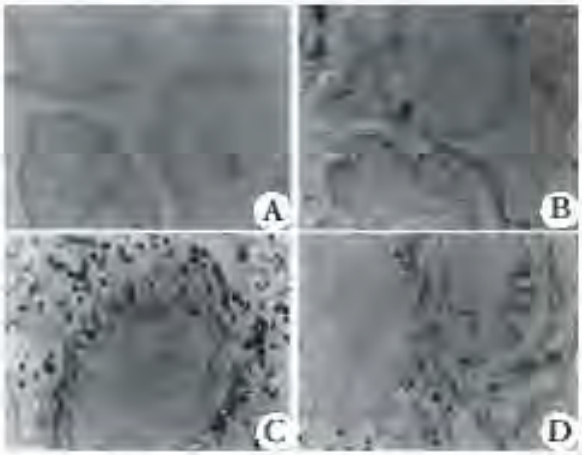


Figura 3: A) Eletrofotomicrografia de pele sã adjacente à pele acometida por melasma, mostrando poucos melanossomas nos ceratinócitos (7000x); B) Eletrofotomicrografia de pele normal adjacente à pele lesada, mostrando melanócito com pequena atividade melanogênica (7000x); C) Eletrofotomicrografia de pele acometida por melasma evidenciando ceratinócito repleto de melanossomas maduros (7000x); D) Eletrofotomicrografia de pele acometida por melasma com melanócito apresentando dendritos proeminentes e maior número de organelas (7000x).

O presente estudo confirma alguns dados da literatura: na análise histopatológica pela coloração de HE, observase hiperpigmentação variável da epiderme, acompanhada de maior elastose da derme, na área acometida pelo melasma em comparação com a pele normal.

O aumento da elastose na pele com melasma tende a sugerir que exposição solar crônica e acentuada seja necessária para o desenvolvimento do processo e que, de certa forma, isso influencie a hiperpigmentação da epiderme. Curiosamente, nem a reação fibroblástica nem o derrame pigmentar acompanham essa alteração localizada na pele afetada pelo melasma.

A coloração pelo Fontana-Masson evidenciou aumento da quantidade de melanina no melasma. Esse achado pôde ser corroborado através da análise citomorfométrica digital, a qual demonstrou em alguns casos aumento de até três vezes na quantidade de melanina na pele com melasma em relação à pele sã.

Tais achados podem sugerir que aumento na síntese de melanossomas nos melanócitos, bem como na transferência dos melanossomas para os ceratinócitos, e menor degradação dessas estruturas nos ceratinócitos, podem ser essenciais para o desenvolvimento das lesões.[3,5,7]

Ainda há controvérsia quanto ao número de melanócitos estar aumentado ou não nas lesões de melasma. Porém, o número de melanócitos na patogênese do melasma parece de importância menor do que em outras discromias, como, por exemplo, os lentigos solares.[1,3,7]

Os achados imuno-histoquímicos deste estudo, acrescidos da análise citomorfométrica digital da quantidade de melanócitos, não demonstraram diferenças significativas no número de melanócitos na pele lesada e na pele sã. Por outro lado, a imunomarcação com Melan-A permitiu a identificação de melanócitos maiores, intensamente marcados e com maior número de dendritos na pele com melasma.

Sanchez e colaboradores[4] sugerem que as alterações morfológicas do melasma parecem estar relacionadas a aumento do número e atividade dos melanócitos, e que essas células estariam funcionalmente alteradas, bem como que a luz solar seja um dos maiores fatores que seletivamente influenciam esse aumento funcional dos melanócitos.

A observação ultra-estrutural, através da microscopia eletrônica de transmissão, revelou maior atividade melanogênica na pele lesada em comparação com a pele sã, evidenciando ceratinócitos repletos de melanossomas maduros e melanócitos com mais organelas e dendritos, o que sugere intensa atividade metabólica desses melanócitos.

Sendo assim, parece que as alterações morfológicas do melasma, que é desordem pigmentar persis-

tente, estão relacionadas a aumento da atividade dos melanócitos e não ao aumento significativo de seu número, induzidas por fatores diversos. Destaque-se o acometimento familiar em todos os pacientes, fortalecendo o argumento da predisposição genética.

Por outro lado, a localização preferencial em áreas fotoexpostas e o aumento da elastose dérmica indicam que a exposição à radiação ultravioleta pode ser o principal envolvido e talvez até o fator desencadeante e mantenedor do quadro clínico.

Outros estudos comparativos devem ser conduzidos a fim de elucidar qual o caminho sinalizador que proporciona todas essas alterações estruturais e funcionais nos melanócitos, tendo como conseqüência a ocorrência de lesões de forma tão peculiar, em locais submetidos a estímulos semelhantes de radiação solar.

CONCLUSÕES

A avaliação dos melanócitos em lesões de melasma demonstrou maior atividade melanogênica na epiderme acometida pela doença em comparação com a área sã adjacente, evidenciando distúrbio funcional local da unidade epidérmico-melânica. ❑

AGRADECIMENTOS:

Aos senhores Carlos César Ramos, Marcos Roberto Franchi e José Carlos Pedroso de Lima, do Departamento de Patologia, pelo processamento do material para histologia, histoquímica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica.

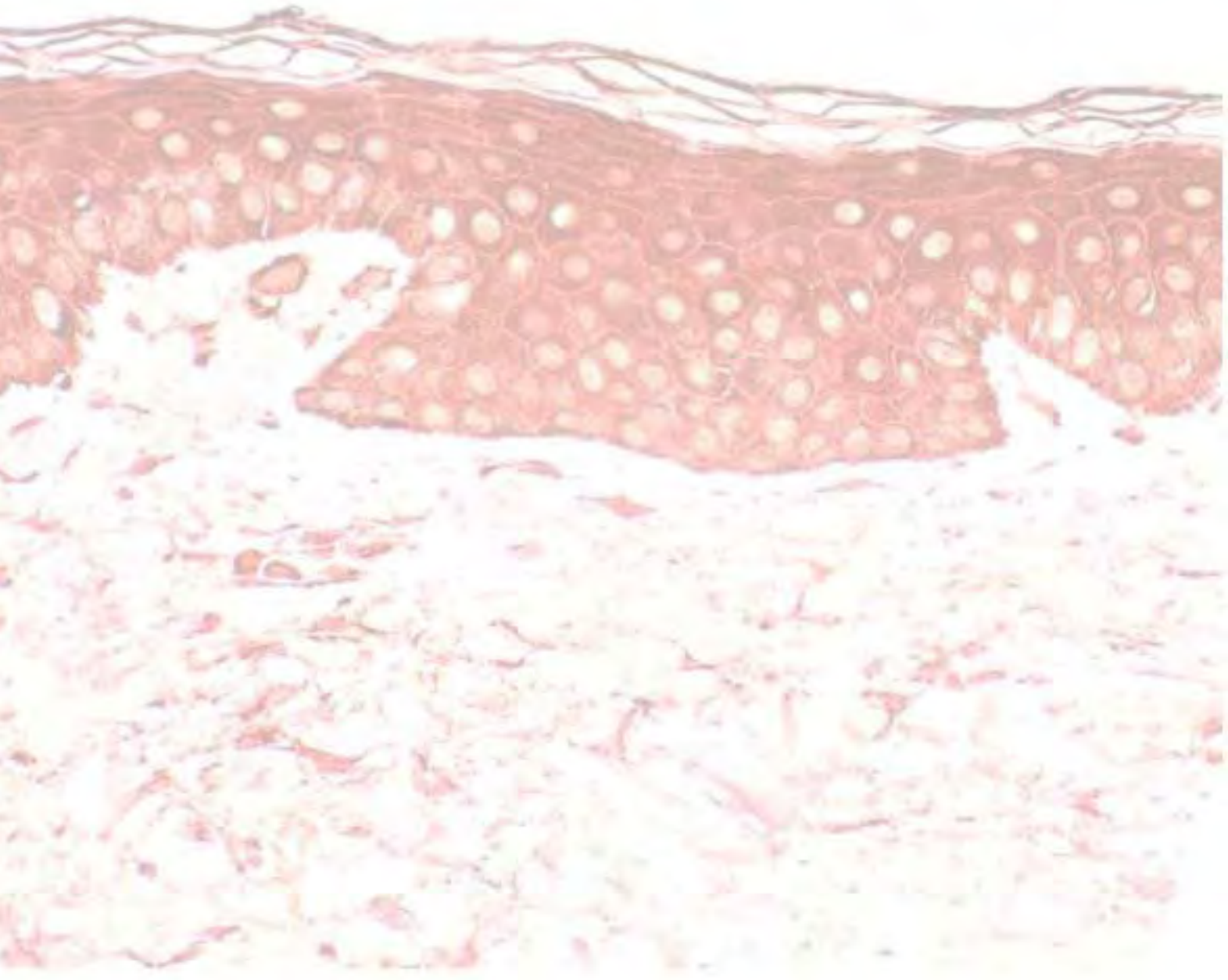
REFERÊNCIAS

1. Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm Jr MC. Melasma. A clinical, light microscopic, ultrastrutural and immunofluorescence study. J Am Acad Dermatol. 1981;4:698-710.
2. Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. Br J Dermatol. 1998;139:932.
3. Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. Internat J Dermatol. 1998;37:897-903.
4. Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP, Hori Y. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors. Dermatology in General Medicine. New York Mcgraw-Hill; 1999. p. 936-44.
5. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, Kim J, Lee KB, Yim H, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. Br J Dermatol. 2002;146:228-37.
6. Guevara IL, Pandya AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin and a fluorinated steroid. Internat J Dermatol. 2001;40:210-5.
7. Ponzio HAS. Contribuição à classificação clínica e histopatológica dos melasmas [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995. 157p.
8. Ponzio HA, Cruz MF. Acurácia do exame sob a lâmpada de Wood na classificação dos cloasmas. An Bras Dermatol. 1993;68:325-8.
9. Grimes PE. Melasma: etiologic and therapeutic considerations. Arch Dermatol. 1995;131:1453.
10. Dominguez-Soto L, Hojyo-Tomoka T, Vega-Memije E, Arenas R, Cores-Franco R. Pigmentary problems in the tropics. Dermatol Clin. 1994;12:777-84.
11. Image J – Image Processing and Anahysis in Java v1.34. [homepage on internet] National Health Institute (NHI). 2005 [cited 2005 Sept 25]. Available from: http://rsb.info.nih.gov/ij/
12. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, dos Santos AS. Bioestat: 2.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá e MCT – CNPq; 2000.
13. Dominguez AR, Balkrishnan R, Ellzey AR, Pandya AG. Melasma in Latina patients: cross-cultural adaptation and validation of a quality-of-life questionnaire in Spanish language. J Am Acad Dermatol. 2006;55:59-66.
14. Sacre RC, Fernandes NC, Vaisman M, Tendrich M. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. An Bras Dermatol. 1996;71:195-8.
15. Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. Br J Dermatol. 1998;139:444-52.
16. Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of [alpha]-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. Br J Dermatol. 2002;146:165-7.
17. Ha Tom, Rees JL. Melanocortin 1 receptor: What's red got to do with it? J Am Acad Dermatol. 2001;45:961-4.
18. Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The Melanocortin-1 receptor and human pigmentation. Ann N Acad Sci. 1999; 885:117-33.
19. Rees JL. The melanocotin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. Review – pigment focus. Pigment Cell Res. 2000;13:135-40.
20. Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. Ann NY Acad Sci. 1999;885:217-29.
21. Rouzaud F, Hearing VJ. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. Peptides. 2005;26:1858-70.
22. Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I, Tada A, Im S, Lamoreux L, et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. Pigment Cell Res. 2000;13:156-62.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:
Luciane Donida Bartoli Miot
Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp, SN. - Campus Universitário de Rubião Jr 18618-000, Botucatu - SP
Tel/Fax (14) 3882 4922
e-mail: lucianemiot@fmb.unesp.br

Como citar este artigo / How to cite this article: Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. An Bras Dermatol. 2007;82(6):529-34

Capítulo V - Manuscrito 3



Texto em português segundo as normas da revista Pigment Cell & Melanoma Research.

Título: Estudo comparativo morfofuncional e expressão de hormônio estimulante de melanócitos do tipo alfa e receptor de melanocortina do tipo 1 em lesões de melasma

Autores:
Luciane Donida Bartoli Miot
Dermatologista do Departamento de Dermatologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Hélio Amante Miot
Professor Assistente Doutor do Departamento de Dermatologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Jossimara Polettini
Pós-graduanda do Departamento de Patologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Márcia Guimarães da Silva
Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Mariângela Esther Alencar Marques
Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia da FMB-Unesp, Botucatu, SP

Endereço para correspondência:
Luciane Donida Bartoli Miot
Departamentos de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Unesp, S/N.
Campus Universitário de Rubião Jr.
18618-000 – Botucatu – SP
E-mail: lucianemiot@fmb.unesp.br
FONE/FAX: 14 3882 4922

Trabalho realizado no ambulatório do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp, laboratórios do Departamento de Patologia da FMB-Unesp e laboratório de virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB-Unesp.

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse relacionado à divulgação dos resultados.
A pesquisa obteve apoio financeiro da FAPESP (Processo: 04/03135-5).

Resumo

Melasma é hipermelanose comum, adquirida, localizada, simétrica, caracterizada por máculas acastanhadas nas áreas fotoexpostas. Sua fisiopatogenia não está completamente elucidada, porém, alterações da secreção do α-MSH e da expressão epidérmica de MC1-R podem ser os mediadores patogênicos da exposição à radiação solar nessa doença. Foram realizadas biópsias de pele com melasma e sã adjacente em 44 pacientes. Parte dos fragmentos obtidos foi submetida à coloração de HE, Fontana-Masson e imunohistoquímica com Melan-A, α-MSH e MC1-R, outra parte foi processada para análise por microscopia eletrônica de transmissão e em alguns casos, submetidos à análise da expressão gênica do MC1-R pela técnica de PCR em tempo real. Foi observado aumento do infiltrado linfohistiocitário e da elastose solar dérmicos na pele com melasma, assim como significativo aumento da melanina epidérmica. À microscopia eletrônica, demonstrou-se número aumentado de melanossomas maduros nos ceratinócitos e melanócitos com organelas citoplasmáticas mais proeminentes na pele com melasma. Não se evidenciaram diferenças entre o número de melanócitos entre os grupos, mas estes foram mais volumosos e com dendritos mais proeminentes na pele lesada. As imunohistoquímicas pelo α-MSH e pelo MC1-R revelaram significativa marcação na epiderme com melasma. A quantificação relativa de RNAm de MC1-R, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as amostras.

Palavras-chave: alfa-MSH, Imunohistoquímica, Melasma, Reação em Cadeia da Polimerase, Receptor tipo 1 de melanocortina.

Abstract

Melasma is a common acquired symmetric hypermelanosis, characterized by brown maculae in photoexposed areas. Its physiopathology is not yet well understood, nevertheless, α-MSH secretion and epidermic MC1-R expression can represent disease's cutaneous mediators of sun exposure. Biopsies were obtained from 44 patients' melasma and healthy adjacent skin. Some pairs of skin biopsies were processed to HE and Fontana-Masson staining, also immunohistochemics to Melan-A, α-MSH and MC1-R. Other biopsies were submitted to transmission electron microscopy and another were prepared to MC1-R gene detection by real-time PCR analysis. Melasma' skin showed an increase in dermic lymphohistiocytic infiltrate and also solar elastosis, even as a significative increase in epidermal melanin was detected. Melanossomas' maturity and quantity were increased and also accentuated citoplasmatic organelles were identified in melasmas' skin by transmission electronic microscopy. Epidermic melanocytes counting was similar between groups, although they were larger and their dendrites were more prominent in melasma's skin. There was a more intense epidermal signalling from α-MSH and MC1-R antibodies in melasma. There was similar RNAm from MC1-R expression between samples.

Key-words: Alpha-MSH, Immunohistochemic, Melasma, PCR, MC1-R, Melasma

Introdução

Melasma é uma discromia adquirida comum, crônica, refratária à terapêutica, altamente recidivante, com importante impacto na vida social, familiar e profissional dos indivíduos que a manifestam. Afeta principalmente mulheres adultas em idade fértil, de todas as etnias, e se caracteriza por máculas hipercrômicas acastanhadas, de diversas tonalidades, simétricas e irregulares, na face e áreas fotoexpostas.[1-8]

Inúmeros fatores estão envolvidos na etiologia da doença, porém nenhum deles pode ser responsabilizado isoladamente pelo seu desenvolvimento. Gravidez, terapias hormonais e contraceptivos orais, cosméticos, drogas fototóxicas, endocrinopatias, estresses emocionais e medicações anti-convulsivas são elementos referidos pela literatura, entretanto, a predisposição genética e exposição às radiações solares, configuram os fatores mais importantes para seu desenvolvimento, já que a doença se manifesta principalmente após períodos de maior exposição à luz solar, como no verão.[1,4,6,8]

Histopatologicamente, observa-se uma hiperatividade melanocítica clonal localizada, com aumento do número e maturidade dos melanossomas, hiperpigmentação melânica de todas as camadas da epiderme e elastose solar, porém, grande parte de sua fisiopatogenia ainda permanece um desafio para os pesquisadores.[2,9,10]

Vários peptídeos como *stem-cell factor*, endotelina 1, fator de crescimento fibroblástico básico, fator de crescimento hepatocítico, interleucina 1, prostaglandina E2 e hormônio estimulante de melanócitos do tipo α (α-MSH), que agem como mitógenos ou melanógenos, são produzidos por ceratinócitos, melanócitos e fibroblastos, interferem na melanização epidérmica e podem exercer algum papel na gênese da doença.[10-16]

O α-MSH é um tridecapeptídeo derivado da proopiomelanocortina (POMC), com uma seqüência idêntica aos 13 primeiros aminoácidos da adrenocorticotropina (ACTH) e que exerce potente efeito melanogênico. Sua síntese ocorre principalmente na adenohipófise, mas também nos ceratinócitos, melanócitos e células de Langerhans.[12,13,15,17-21]

Sugere-se que uma forte imunorreatividade ao α-MSH na epiderme com melasma represente um dos mais importantes fatores na formação dessa entidade.

Por outro lado, relação entre fotoexposição e a maior imunorreatividade de α-MSH na pele lesada ainda não foi elucidada.[22]

O receptor de melanocortina tipo 1 (MC1-R) é uma proteína G transmembrana composta por 317 aminoácidos, sintetizada a partir do gene situado no cromossomo 16q24.3.[12,23,24]

Na epiderme, o α-MSH sinaliza através do MC1-R, ativando a adenilciclase e aumentando a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, resultando em produção do pigmento escuro de eumelanina, influenciando as quantidades relativas de feomelanina e eumelanina produzidas pelo melanócito.[20,23-29]

Variações relacionadas ao gene MC1-R são excepcionalmente freqüentes entre caucasianos e têm um significante impacto no fenótipo pigmentar deste grupo étnico.[30]

Dessa forma, a existência de, um caminho sinalizador, com aumento de expressão do MC1-R, pode desempenhar um papel significante nessa maior imunorreatividade ao α-MSH e contribuir no entendimento da fisiopatogenia do melasma.[2,22]

O presente estudo teve por objetivo avaliar as alterações morfológicas e funcionais e a expressão de MC1-R e α-MSH na pele acometida por melasma, comparada à pele sã perilesional.

Métodos

Pacientes

Foram incluídos no estudo 44 pacientes portadores de melasma facial, voluntários, adultos, sem restrição por sexo ou fototipo, dentre os atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2008, e que concordaram em fornecer material (biópsia cutânea) para estudo molecular, histoquímico, imunohistoquímico e de microscopia eletrônica.

Excluíram-se pacientes com diagnóstico de colagenoses, discrasias sangüíneas, sob uso de medicação anticoagulante, imunossuprimidos, diabéticos, hipertensos graves, gestantes e lactantes.

O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo II).Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III).

Obtenção dos fragmentos de pele

Sob anestesia local, foram realizadas biópsias, (*punch* 2 mm) da pele facial acometida pelo melasma e pele adjacente normal, respeitando o limite máximo de 2 cm entre as amostras.

Os fragmentos obtidos foram fixados em formalina tamponada 10%, glutaraldeído 2,5% ou acondicionados em *RNA later*® e mantidos a 4°C por até 4 horas; e encaminhados para a histoquímica, imunohistoquímica, microscopia eletrônica e PCR em tempo real.

Processamento das amostras para histoquímica e imunohistoquímica

Os fragmentos de tecido foram incluídos em blocos de parafina e preparados cortes de 4 μm de espessura para coloração pelos métodos histoquímicos clássicos de Hematoxilina-Eosina (HE) e Fontana-Masson.

Para a realização das marcações imunohistoquímicas, cortes de 4 μm foram submetidos a reações com anticorpos Melan-A (1:100) (DakoCytomation), α-MSH

(1:1000) (Chemicon International) ou MC1-R (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, INC). Para a revelação das reações, as lâminas foram incubadas com solução 3,3 diaminobenzidina (DAB) 0,08% em PBS. Posteriormente, as lâminas foram contra-coradas com Giemsa para evidenciar a melanina.[31]

Processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão

Vinte fragmentos pareados de tecido (pele sã e melasma) foram processados para análise de microscopia eletrônica. Os cortes semi-finos (0,5 μm) foram corados à quente com solução de azul de toluidina a 1% em bórax e examinados em microscópio de luz para seleção dos blocos com as áreas de interesse. Dos blocos escolhidos foram obtidos cortes ultra-finos (50 nm), que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo por 20 minutos.

O exame e documentação fotográfica dos materiais foram realizados em microscópio LEO 900.

Processamento das amostras para PCR em tempo real

Quatorze fragmentos pareados de tecido (pele sã e melasma) foram acondicionados em *eppendorfs* contendo RNA *later*® e submetidos à extração de RNA total, por meio do kit Illustra (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado pela leitura em aparelho Nano Drop ND 1000.

Após a extração do RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2 μg/μL foram submetidas à obtenção de cDNA, utilizando-se o High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi utilizado na detecção e quantificação da expressão gênica do MC1-R pela técnica de PCR em tempo real.

O gene de MC1-R foi amplificado usando-se 20X TaqMan® Gene Expression Assays – cat n° HS 01116762_s1 em ABI Prism® 7300 Sequence Detector.

Em todos os ensaios as amostras foram processadas em duplicata. Paralelamente, foi realizada a amplificação do gene da β-actina como controle endógeno para comparação da expressão gênica.

O cDNA de referência para o gene estudado consistiu da mistura de vários cDNAs produzidos a partir das próprias amostras de pele sã e lesada incluídas na análise. A curva padrão foi estabelecida de acordo com os dados fornecidos pelo programa SDS versão 1.2.3 (Applied Biosystems), produzidos em cada diluição. As quatro diluições que apresentaram Ct entre os ciclos 25 e 35 foram escolhidas para constituir a curva padrão utilizada em todas as reações.

Análise de imagem digital

Os cortes histológicos submetidos à microscopia de luz foram fotografados em triplicata, sob iluminação e balanço de branco padronizados, em aumento de 400X, empregando câmera digital Sony S75, com resolução de 1600x1200, 24 bits de profundidade de cor, armazenados em arquivos .jpg na qualidade “FINE”.

A inflamação dérmica foi estimada na coloração de HE a partir da densidade de partículas equivalentes a linfócitos, com circularidade de até 50%, segmentadas da imagem pela identificação de clusteres de cor (Anexo IV).[2,32,33]

A densidade de melanina na epiderme foi avaliada na coloração de Fontana-Masson a partir da identificação dos pixels equivalentes à melanina, na epiderme interfolicular, segmentados em clusteres de cor (Anexo IV).[2,33,34]

A densidade linear de melanócitos na camada basal foi determinada a partir da marcação pelo Melan-A, identificadas as partículas equivalentes a melanócitos pela segmentação em clusteres de cores (Anexo IV).[2,35]

Para a avaliação da marcação imunohistoquimímica da epiderme (α-MSH e MC1-R) foi selecionado o canal “blue”, corrigida a nuance de cor, subtraído a luz do fundo e estimada a mediana do histograma de intensidade de cor dos pixels da epiderme interfolicular (Anexo IV).[36]

Todas as análises de imagem foram realizadas pelo software ImageJ 1.38x.[33,37]

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística empregando-se o software BioEstat 4.0.[38] Variáveis contínuas foram submetidos ao teste de Lilliefors para verificação da normalidade da distribuição amostral. Distribuições paramétricas

foram representadas pelas médias aritméticas e desvios-padrões e comparadas pelo teste T de Student para amostras pareadas; e as distribuições não paramétricas foram representadas pelas medianas e desvios interquartílicos comparadas pelo teste de Wilcoxon.[38] Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%, com distribuição de probabilidade bicaudal.

Resultados

A análise comparativa das lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina, ao microscópio de luz (Figuras 1 A e B), demonstrou um aumento da melanina principalmente na camada basal da epiderme e infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular de leve a moderada intensidade, nos casos de melasma em comparação com a pele adjacente normal. Além disso, epiderme mais retificada, camada córnea mais compacta e elastose da derme superficial foram achados mais evidentes nos cortes de pele lesada. A análise digital da densidade de partículas equivalentes a linfócitos na derme revelou um aumento significativo na pele lesada em relação à pele normal ($p<0,01$). Para essa análise, foram usados fragmentos de pele de 24 pacientes (Tabela 1). A média das razões das densidades de partículas equivalentes a linfócitos, entre os fragmentos de pele lesada e sã, foi de 1,18 variando de 0,85 a 1,87.

A análise das lâminas coradas pelo Fontana-Masson, ao microscópio de luz (Figuras 1 E e F), evidenciou um importante aumento da melanina em todas as camadas da epiderme, na pele acometida pelo melasma em relação à pele normal. A análise digital da densidade de melanina da epiderme, presente nos cortes de pele corados pelo Fontana-Masson, avaliados à microscopia de luz, demonstrou significativo aumento da quantidade de melanina na pele lesada ($p<0,01$). Para essa análise, foram usados fragmentos de pele de 22 pacientes (Tabela 1). A média das razões das densidades de melanina, entre os fragmentos de pele lesada e sã, foi de 1,10 variando de 0,85 a 1,42.

Na análise comparativa das lâminas marcadas com Melan-A e contra coradas com Giemsa, ao microscópio de luz (Figuras 1 C e D), notou-se melanócitos maiores, intensamente marcados e com dendritos mais proeminentes, na pele com melasma em comparação com a pele normal. A contra coloração com Giemsa permitiu a identificação da melanina por uma marcação de padrão azul-esverdeado, diferenciando-a da marcação imunohistoquímica pelo anticorpo de interesse.[31] A análise digital do reconhecimento de partículas com intensidade de cor equivalente aos melanócitos da epiderme não demonstrou diferença significativa entre a pele lesada e sã ($p>0,10$) (Tabela 1). Para essa análise, foram usados fragmentos de pele de 22 pacientes.

A análise pela microscopia eletrônica de transmissão demonstrou número e proporção aumentados de melanossomas maduros dentro dos ceratinócitos, além de melanócitos com mais organelas na pele com melasma em relação à normal (Figura 2).

A epiderme, tanto da pele com melasma quanto da pele sã perilesional, foi marcada integralmente pelo anticorpo anti-α-MSH, assim como os folículos pilosos (Figuras 3 A e B). O mesmo padrão foi observado na marcação pelo anticorpo anti-MC1-R (Figuras 3 C e D). A análise digital da intensidade mediana de marcação imunohistoquímica da epiderme, pelo anticorpo α-MSH, demonstrou maior marcação, estatisticamente significativa, na pele acometida por melasma em comparação a pele normal adjacente ($p<0,05$) (Tabela 1). Para essa análise, foram usados fragmentos de pele de 24 pacientes. A média das razões das intensidades de marcação pelo anticorpo α-MSH, entre os fragmentos de pele lesada e sã, foi de 1,08 variando de 0,72 a 1,64. A análise digital da intensidade de marcação da epiderme, pelo anticorpo MC1-R, demonstrou maior marcação na pele com melasma em comparação com a pele normal adjacente ($p<0,05$) (Tabela 1). Para essa análise, foram usados fragmentos de pele de 15 pacientes. A média das razões das intensidades de marcação pelo anticorpo MC1-R, entre os fragmentos de pele lesada e sã, foi de 1,18 variando de 0,81 a 1,61.

A quantificação relativa de RNAm de MC1-R nas amostras de pele sã e lesada está apresentada na Figura 4. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nessa expressão entre os grupos ($p>0,10$).

Não foram observadas complicações decorrentes do procedimento de coleta dos fragmentos de pele.

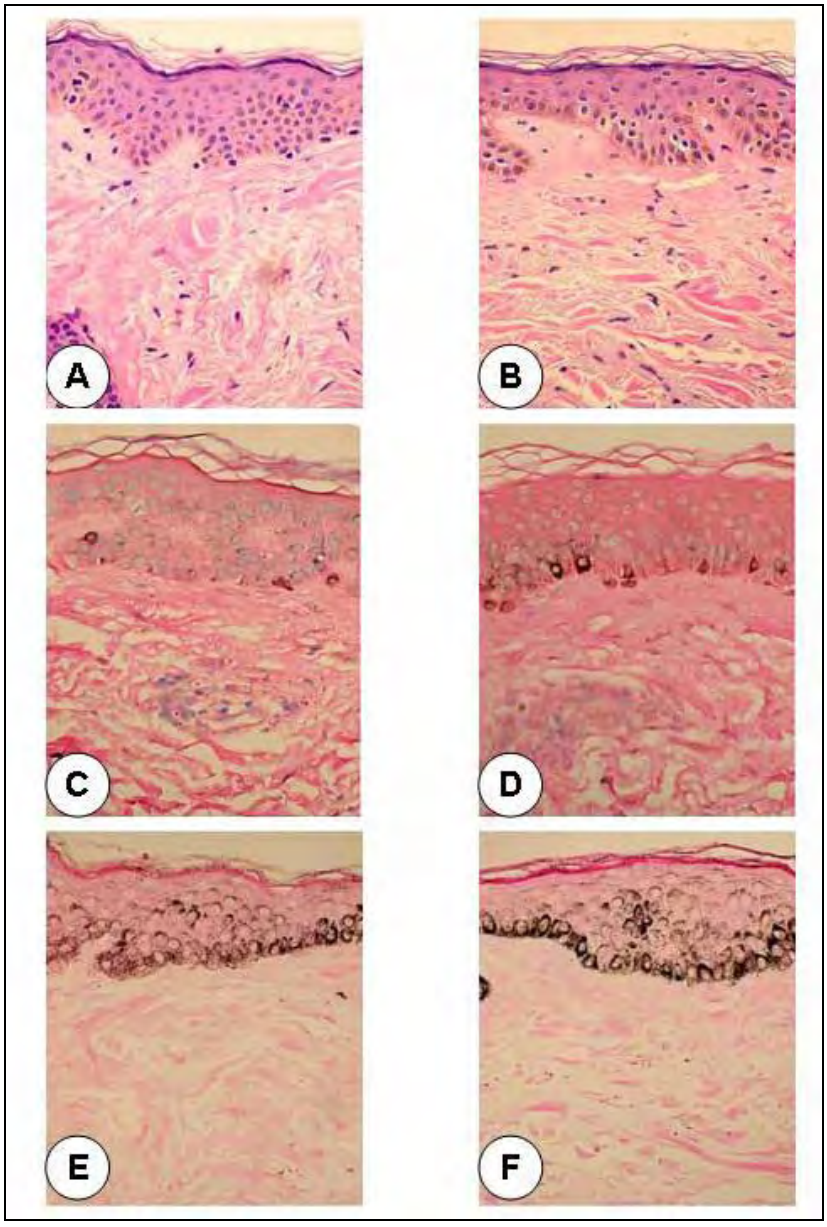


Figura 1. **A)** Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, retirado de região adjacente à pele acometida por melasma. (HE, 400X); **B)** Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele acometida por melasma, evidenciando a camada basal da epiderme com melanina aumentada em relação ao normal e derme com leve infiltrado inflamatório perivascular (HE, 400X);); **C)** Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, retirado de região adjacente à pele acometida por melasma. (Melan-A/Giemsa, 400X); **D)** Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele acometida por melasma, com melanócitos maiores, intensamente marcados e com dendritos mais proeminentes (Melan-A/Giemsa, 400X) **E)** Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, retirado de região adjacente à pele acometida por melasma. (Fontana-Masson, 400X); **F)** Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele acometida por melasma, evidenciando a camada basal da epiderme com melanina aumentada em relação ao normal (Fontana-Masson, 400X.

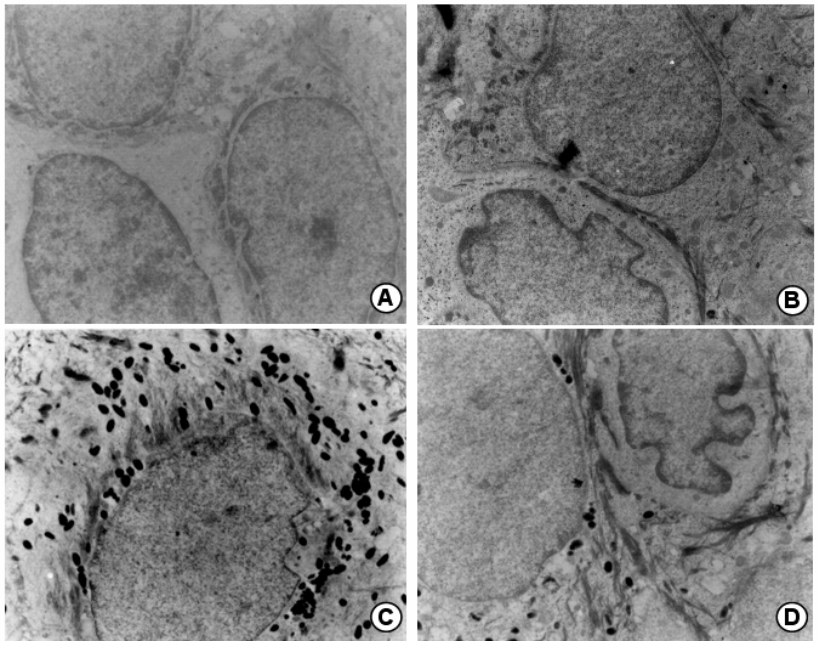


Figura 2. **A)** Eletrofotomicrografia de pele sã adjacente à pele acometida por melasma, mostrando poucos melanossomas nos ceratinócitos (7000X); **B**) Eletrofotomicrografia de pele normal adjacente à pele lesada, mostrando melanócito com pequena atividade melanogênica (7000X); **C)** Eletrofotomicrografia de pele acometida por melasma evidenciando ceratinócito repleto de melanossomas maduros (7000X); **D)** Eletrofotomicrografia de pele acometida por melasma com melanócito apresentando maior número de organelas (7000X).

Tabela 1. Avaliação comparativa de parâmetros microscópicos pela análise de imagem digital.

Variável	Pele Lesada	Pele Sã	Valor de p
Inflamação na derme (mediana ± iqd)	0.80±0.34	0.69±0.28	<0.01
Melanócitos na epiderme (média ± dp)	11.99±3.94	13.35±3.97	0.17
Densidade de melanina na epiderme (média ± dp)	0.37±0.02	0.34±0.02	<0.01
Intensidade de MSH na epiderme (média ± dp)	139.43±18.01	130.50±18.37	0.04
Intensidade de MC1-R na epiderme (média ± dp)	58.02±12.13	51.84±9.37	0.02

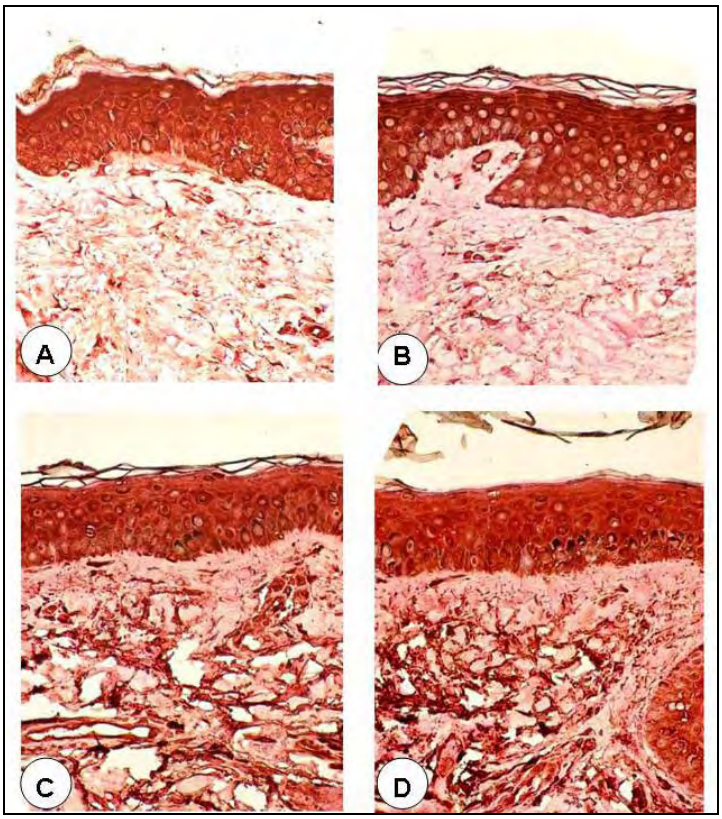
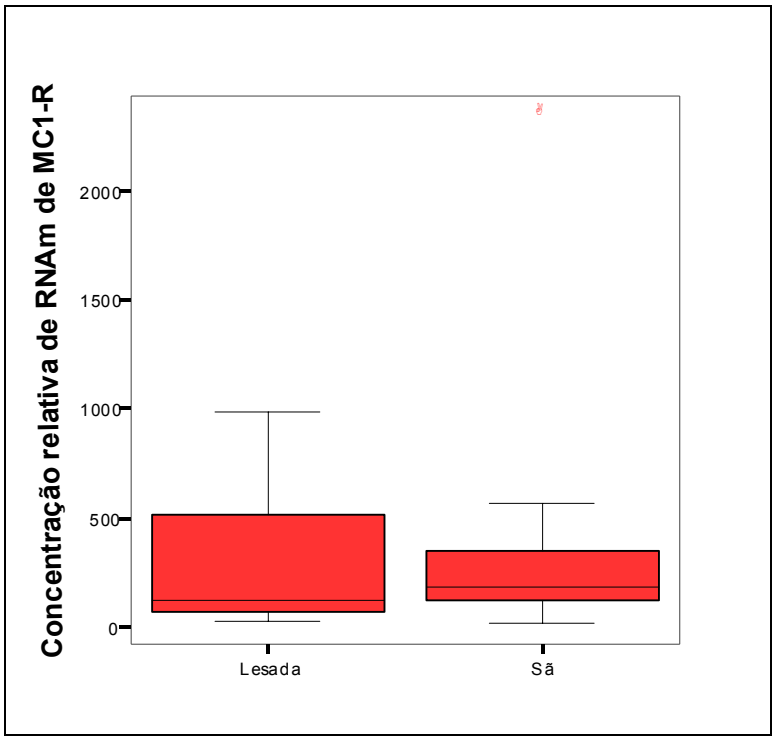


Figura 3. **A)** Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, retirado de região adjacente à pele acometida por melasma demonstrando imunomarcação epidérmica difusa. (α-MSH, 400X); **B)** Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele acometida por melasma, demonstrando o mesmo padrão (α-MSH, 400X); **C)** Pele sã: fotomicrografia de fragmento de pele normal, retirado de região adjacente à pele acometida por melasma evidenciando imunomarcação difusa epidérmica. (MC1-R, 400X); **D)** Pele lesada: fotomicrografia de fragmento de pele acometida por melasma, evidenciando o mesmo padrão (MC1-R, 400X).



Teste de Wilcoxon N=14 Z=-0,282 p=0,778

Figura 4. *Box-plot* representando a concentração relativa de RNAm de MC1-R em amostras de pele sã e lesada. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers.*

Discussão

Melasma é uma doença freqüente na população geral, que gera grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e movimenta grandes esforços da pesquisa clínica e farmacêutica no desenvolvimento de tratamentos. Entretanto, o conhecimento relacionado a sua fisiopatogenia ainda é muito limitado.[10,39]

Há poucos estudos tentando esclarecer os fatores verdadeiramente envolvidos na etiopatogenia do melasma, portanto definir os aspectos morfológicos e funcionais relacionados à doença é requisito importante para o entendimento da sua real gênese.

Nesse estudo, na análise das lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina, observou-se aumento da melanina epidérmica e infiltrado inflamatório linfohistiocitário perivascular de leve a moderada intensidade nos casos de melasma em comparação com a pele adjacente normal. A epiderme apresentou-se mais retificada e a camada córnea mais compacta, além da elastose mais intensa da derme superficial nos cortes de pele lesada, configurando sinais de dano actínico mais acentuado nesse grupo.

A exposição à radiação solar altera de forma geral a arquitetura da pele, promovendo espessamento da camada córnea, adelgaçamento da epiderme, vacuolização da camada basal, derrame pigmentar e elastose na derme superficial, degeneração do colágeno e infiltrado inflamatório dérmico. Funcionalmente, o colágeno do tipo I torna-se reduzido e há diminuição no número de células de Langerhans na epiderme. Todas as vias desse processo, assim como a ordem dos acontecimentos, não estão ainda completamente esclarecidas. Além das alterações epidérmicas decorrentes da supressão metabólica dos ceratinócitos, há um desequilíbrio metabólico oxidativo na síntese da substância fundamental e expressão de metaloproteinases na derme.[11,40-43]

Em um estudo de pele de mulheres coreanas, Kang et al.[2] também observaram elastose solar mais proeminente na derme superficial dos pacientes com melasma quando comparada à pele normal, sugerindo que melasma pode se desenvolver pela ativação de melanócitos, desencadeadas por mudanças na derme, causadas pela radiação solar. O aumento comparativo da elastose solar na derme superficial com melasma configura um processo de dano actínico na pele, tal como as alterações funcionais de fibroblastos, podendo influenciar o desenvolvimento de

hiperpigmentação na epiderme adjacente.[11,40,41,44-46] A celularidade dérmica aumentada nos pacientes com melasma, assim como a elastose solar proeminente podem indicar processo inflamatório e dano oxidativo localmente exacerbado. Nesse sentido, evidências sugerem que após exposição à radiação ultravioleta do tipo B, ceratinócitos produzem fator *stem cell*, fator de crescimento básico fibroblástico, interleucina-1, endotelina-1, α-MSH e ACTH, que são substâncias que promovem *upregulation* na proliferação dos melanócitos humanos e intensificam a melanogênese. Tomita et al.[47] relataram que prostaglandinas são secretadas pela epiderme irradiada por radiação ultravioleta tipo B, e Prostaglandinas E_2, tromboxane B_2 e, principalmente leucotrieno C_4 induzem aumento do tamanho dos melanócitos e estimulam a formação de dendritos proeminentes. A liberação de citocinas e prostaglandinas pró-inflamatórias, seguidas à exposição solar, poderia levar a efeitos estimulatórios nos melanócitos de pacientes com melasma e justificar a hiperpigmentação epidérmica e inflamação dérmica, tal qual ocorre nas hiperpigmentações pós-inflamatórias.[10,47,48] Fibroblastos dérmicos humanos ativados secretam várias citocinas melanogênicas, tais como fator *stem cell* e fator de crescimento hepatocítico, que se encontram aumentadas na derme de pacientes com melasma, sugerindo que um aumento do número e ativação dos fibroblastos, por radiação ultravioleta, gere alterações na substância fundamental, elastose dérmica e ativação dos melanócitos na epiderme. Já foi comprovada a capacidade dessas citocinas, secretadas pelos fibroblastos, em estimular a proliferação e melanogênese de melanócitos em cultura.[11] Todavia, o infiltrado inflamatório perivascular e elastose solar, apesar de aumentados na pele com melasma, também são observados na pele sã adjacente fotoexposta, e células de Langerhans CD1a-positivas encontram-se presentes de forma semelhante em ambos os grupos, justamente como ocorre em pacientes com fotoenvelhecimento sem melasma.[10] Esse fato não invalida a possibilidade de ocorrerem diferenças funcionais dessas células preferencialmente na pele lesada. A ausência de sintomatologia clínica em quaisquer fases do desenvolvimento do melasma enfraquece a hipótese de que a doença seja causada por um processo inflamatório local.

Melanócitos humanos podem responder a fatores angiogênicos, já que expressam receptores para fator de crescimento endotelial vascular funcional (VEGF).[49] Kim et al.[50] demonstraram um significante aumento tanto no número quanto no tamanho dos vasos sanguíneos, na pele acometida por melasma,

sugerindo uma maior angiogênese ou telangiectasias. A RUV do tipo B induz, na pele, um estímulo angiogênico. Nesse mesmo estudo, também evidenciou-se que a expressão de VEGF estava mais pronunciada nas lesões de melasma em comparação com a pele sã adjacente perilesional. Porém, o significado dessas alterações ainda não pode ser totalmente esclarecido, já que todos esses achados podem ser decorrentes apenas de uma exposição crônica a RUV. Além disso, esteróides, usados em formulações tópicas para tratamento, induzem a formação de telangiectasias, por um estímulo da angiogênese local.

A análise da melanogênese epidérmica, nas lâminas coradas pelo Fontana-Masson, demonstrou nítido aumento da quantidade de melanina até as mais altas camadas da epiderme nos pacientes com melasma. Kang et al.[2] também observaram esse padrão em mulheres coreanas, sugerindo uma síntese aumentada de melanossomas nos melanócitos, bem como uma aumentada transferência e menor degradação dessas organelas nos ceratinócitos. Em contrapartida, a análise numérica dos melanócitos, nas lâminas marcadas pelo Melan-A, não apresentou diferença entre os grupos, mas sim evidente aumento do volume das células individuais, maior projeção para derme e aumento no número de dendritos. Esses achados são corroborados pela microscopia eletrônica de transmissão que evidenciou maior atividade metabólica celular, além de indícios de maior intensidade de produção e transferência de melanossomas mais maduros na pele lesada.

Há poucos relatos que demonstram aumento no número de melanócitos na pele com melasma comparado a pele normal de controle.[2] Entretanto, em um desses estudos a maioria das amostras utilizadas como controle foi retirada dos braços, que é um local que apresenta diferença constitucional na densidade de melanócitos.[3] Além disso, a imunomarcação com DOPA, a qual foi utilizada para análise, produz resultados menos consistentes, o procedimento é mais moroso e sofre influência da RUV. Esses elementos valorizam a comparação com pele sã adjacente na face e a marcação pelo Melan-A para essa análise.[2,3]

A presença de melanófagos na derme tem sido descrita como equivalente nas peles sã e lesada e admite-se que seja decorrente do fotodano epidérmico, não apresentando papel específico na gênese do melasma, tendo em vista que o melanócito perde sua capacidade de produção e transferência de melanina dentro do macrófago dérmico.[2,6,8,10,34] Kang et al.[2] referiram que os melanófagos estão presentes na derme normal dos japoneses, não funcionando como marcadores de

melasma dérmico. Ponzio também encontrou semelhanças entre a distribuição de melanina dérmica na pele sã e lesada de pacientes com melasmas de diferentes tipos clínicos.[8]

A constatação de que o melasma representa uma hipermelanização epidérmica local, por aumento da função de clones de melanócitos ativados pela radiação ultravioleta, é um conceito bem estabelecido.[3] A avaliação subjetiva dos melanócitos pode levar à falsa impressão de sua maior densidade na pele lesada, pelo fato de estarem aumentados de volume e intensamente marcados. A liberação de citocinas pró-inflamatórias e a radiação ultravioleta têm efeito não só melanogênico como mitogênico para melanócitos, o que poderia justificar, em alguns casos, o número aumentado nas lesões, como é citado em alguns estudos.[3,11]

O aumento da atividade melanocítica local, em detrimento do aumento do número de melanócitos, permanece como a alteração morfofuncional mais importante no melasma, como ocorre nas efélides, ao contrário do que se observa nos lentigos solares, onde há proliferação de melanócitos.[3,10,51]

Os principais elementos locais envolvidos no estímulo da melanogênese são o α-MSH e seu receptor, MC1-R.[52] Neste estudo, houve intensa marcação epidérmica dos ceratinócitos e dos melanócitos por esses anticorpos, em ambos os grupos, porém, com significativa proeminência nos fragmentos de pele com melasma.

Foi demonstrado que a radiação ultravioleta faz uma *upregulation* no funcionamento e expressão de MC1-R em células de melanoma e aumenta a ligação do α-MSH aos melanócitos humanos em cultura. A radiação ultravioleta pode ainda aumentar a sensibilidade dos melanócitos ao α-MSH e explicar porque o escurecimento da pele, promovido pelos efeitos do MSH e ACTH, é especialmente pronunciado em áreas da pele que normalmente são expostas ao sol.[21]

A expressão aumentada de α-MSH epidérmico na pele com melasma sugere que os ceratinócitos podem exercer um papel fundamental na gênese do processo, e, como tanto radiação ultravioleta, como α-MSH representam fatores que aumentam a expressão de MC1-R, é difícil a constatação de que o aumento detectado seja uma alteração primária ou secundária da doença.

Evidências sugerem que os melanócitos da pele com melasma são localmente hiperfuncionantes pelo estímulo específico parácrino de substâncias

melanogênicas, secretadas por ceratinócitos vizinhos, influenciados por fatores ambientais, entre eles, a radiação ultravioleta e hormônios sexuais esteróides.[22,53-55]

Os níveis relativos da expressão de MC1-R em ceratinócitos, melanócitos normais e células de melanoma não são bem estabelecidos e o número de moléculas de receptores por células é variável, dessa forma dificultando estudos quantitativos convencionais.[56] Um estudo que empregou marcação imunohistoquímica e análise subjetiva não foi capaz de detectar diferença entre os grupos.[22] Em nosso estudo, o emprego de métodos de análise de imagem digital, permitiu identificação de diferenças na intensidade de marcação da pele lesada. A comprovação da síntese de RNAm de MC1-R na epiderme, por técnicas de biologia molecular, pode fornecer mais subsídios para o entendimento do processo fisiopatogênico do melasma.

Embora o aumento da expressão de MC1-R na pele acometida por melasma seja um possível mecanismo envolvido no acometimento localizado da doença, no presente estudo, a concentração relativa de RNAm de MC1-R não diferiu nos fragmentos de pele lesada e sã. Esses resultados podem ser explicados, em parte, pela pequena quantidade de amostras processadas para essa avaliação. Porém, é importante considerar que a presença de RNAm, não significa, necessariamente produção de proteína. Além disso, já é conhecido que a diferença na quantidade de um RNAm específico, entre amostras biológicas, não é necessariamente refletida por diferença equivalente na quantidade de proteína.[57] Portanto, a similar concentração relativa de RNAm encontrada nos fragmentos de pele lesada e sã pode ser reflexo de controle pós-transcricional na pele sã, não produzindo a mesma quantidade de MC1-R nesse fragmento. Sem dúvida, a comprovação dessa hipótese envolve a quantificação do receptor nos fragmentos de pele sã e lesada, o que poderá contribuir para o entendimento do mecanismo envolvido na patogênese do melasma.

O presente estudo identificou maior dano solar e inflamação na epiderme com melasma, assim como a pigmentação mais intensa em decorrência de uma maior atividade melanocítica focal. A identificação de níveis aumentados de α-MSH e MC1-R epidérmicos sugere um envolvimento parácrino no controle da pigmentação local e lança argumentos para a investigação da participação dos ceratinócitos no processo fisiopatogênico do melasma.

Outros estudos devem ser conduzidos no caminho da elucidação dos diversos elementos envolvidos na fisiopatogenia do melasma, tendo como consequência a ocorrência de lesões de forma tão peculiar, uma vez que somente a diferença quantitativa no MC1-R não seria uma única explicação para a real fisiopatogênese do melasma, diante da imensa quantidade de fatores envolvidos.

Enquanto muitas dessas respostas não forem respondidas, a fisiopatogenia do melasma permanece um mistério para os pesquisadores; suas lesões, uma fonte de ansiedade para os pacientes, e sua terapêutica, um desafio para os clínicos.

CONCLUSÕES

A avaliação da pele acometida por melasma evidenciou maiores sinais de fotoagressão, inflamação e atividade melanogênica, quando comparada com a pele sã perilesional, evidenciando um distúrbio funcional local da unidade epidérmico-melânica.

A maior imunorreatividade epidérmica de α-MSH e MC1-R na pele lesada indica a importância desses dois elementos no mecanismo de hiperpigmentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1 Mosher DB FT, Ortonne JP,Hori Y. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 936-44.

2 Kang WH, Yoon KH, Lee ES et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002; 146: 228-37.

3 Sanchez NP, Pathak MA, Sato S et al. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 698-710.

4 Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1998; 139: 932.

5 Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int J Dermatol* 1998; 37: 897-903.

6 Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1453-7.

7 Guevara IL, Pandya AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and a fluorinated steroid. *Int J Dermatol* 2001; 40: 212-5.

8 Ponzio HAS. Contribuição a classificação clínica e histopatológica dos melasmas. . In, Vol. Tese de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, 1995: 157.

9 Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol* 1998; 139: 444-52.

10 Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 96-101.

11 Kang HY, Hwang JS, Lee JY et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol* 2006; 154: 1094-9.

12 Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA et al. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 2005; 571: 133-52.

13 Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N et al. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1701-8.

14 Prusis P, Schioth HB, Muceniece R et al. Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide. *J Mol Graph Model* 1997; 15: 307-17, 34.

15 Jimbow K QJW, Fitzpatrick TB, Prota G. Biology of Melanocytes. . In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 192-220.

16 Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick TB et al. Biology of Melanocytes. . In: *Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in General Medicine.*, Vol. 1. New York: Mcgraw-Hill, 1999: 192-220.

17 Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000; 13 Suppl 8: 156-62.

18 Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 217-29.

19 Rouzaud F, Hearing VJ. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides* 2005; 26: 1858-70.

20 Voisey J, Carroll L, van Daal A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets* 2003; 4: 586-97.

21 Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 1998; 11: 265-74.

22 Im S, Kim J, On WY et al. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol* 2002; 146: 165-7.

23 Rees JL. The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 135-40.

24 Gantz I, Yamada T, Tashiro T et al. Mapping of the gene encoding the melanocortin-1 (alpha-melanocyte stimulating hormone) receptor (MC1R) to human chromosome 16q24.3 by Fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 19: 394-5.

25 Rees JL, Birch-Machin M, Flanagan N et al. Genetic studies of the human melanocortin-1 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 134-42.

26 Tan CP, McKee KK, Weinberg DH et al. Molecular analysis of a new splice variant of the human melanocortin-1 receptor. *FEBS Lett* 1999; 451: 137-41.

27 Scott MC, Wakamatsu K, Ito S et al. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci* 2002; 115: 2349-55.

28 Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 433-9.

29 Ha T, Rees JL. Melanocortin 1 receptor: what's red got to do with it? *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 961-4.

30 Branicki W, Brudnik U, Kupiec T et al. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci* 2007; 52: 349-54.

31 Salvio AG, Ribeiro DA, Marques ME. Identification of neoplastic cells in the lymphocytic infiltrate associated with thin melanomas. *Histopathology* 2007; 50: 942-4.

32 Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H et al. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 1996; 105: 333-55.

33 Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 2007; 43: 25-30.

34 Miot LDB, Miot HA, Silva MG et al. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol* 2007; 82: 529-64.

35 Lee ES, Kim JH, Im S et al. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *Int J Dermatol* 2001; 40: 45-9.

36 Brey EM, Lalani Z, Johnston C et al. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 575-84.

37 Papadopulos F, Spinelli M, Valente S et al. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol* 2007; 31: 401-7.

38 Ayres M, Ayres Jr M, Ayres D et al. *Bioestat 4.0 - Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* , Vol. 1. Belém-PA: Sociedade Civil Mamirauá e MCT – CNPq. , 2004.

39 Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol* 2003; 149: 572-7.

40 Naru E, Suzuki T, Moriyama M et al. Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* 2005; 153 Suppl 2: 6-12.

41 Sander CS, Chang H, Salzmann S et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 618-25.

42 Bhawan J, Andersen W, Lee J et al. Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 154-9.

43 McCullough JL, Kelly KM. Prevention and treatment of skin aging. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 323-31.

44 Wlaschek M, Heinen G, Poswig A et al. UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 550-6.

45 Wang H, Shang L, Hao W. [The induction of apoptosis and reactive oxygen species in human skin fibroblast by ultraviolet A]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2003; 35: 69-73.

46 Honda A, Abe R, Makino T et al. Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *J Dermatol Sci* 2008; 49: 63-72.

47 Tomita Y, Maeda K, Tagami H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res* 1992; 5: 357-61.

48 Grimes P, Nordlund JJ, Pandya AG et al. Increasing our understanding of pigmentary disorders. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: S255-61.

49 Kim EJ, Park HY, Yaar M et al. Modulation of vascular endothelial growth factor receptors in melanocytes. *Exp Dermatol* 2005; 14: 625-33.

50 Kim EH, Kim YC, Lee ES et al. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci* 2007; 46: 111-6.

51 Noblesse E, Nizard C, Cario-Andre M et al. Skin ultrastructure in senile lentigo. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 95-100.

52 Carlson JA, Linette GP, Aplin A et al. Melanocyte receptors: clinical implications and therapeutic relevance. *Dermatol Clin* 2007; 25: 541-57, viii-ix.

53 Ranson M, Posen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones: in vitro studies with 1 alpha-25, dihydroxyvitamin D3, alpha-melanocyte stimulating hormone, and beta-estradiol. *J Invest Dermatol* 1988; 91: 593-8.

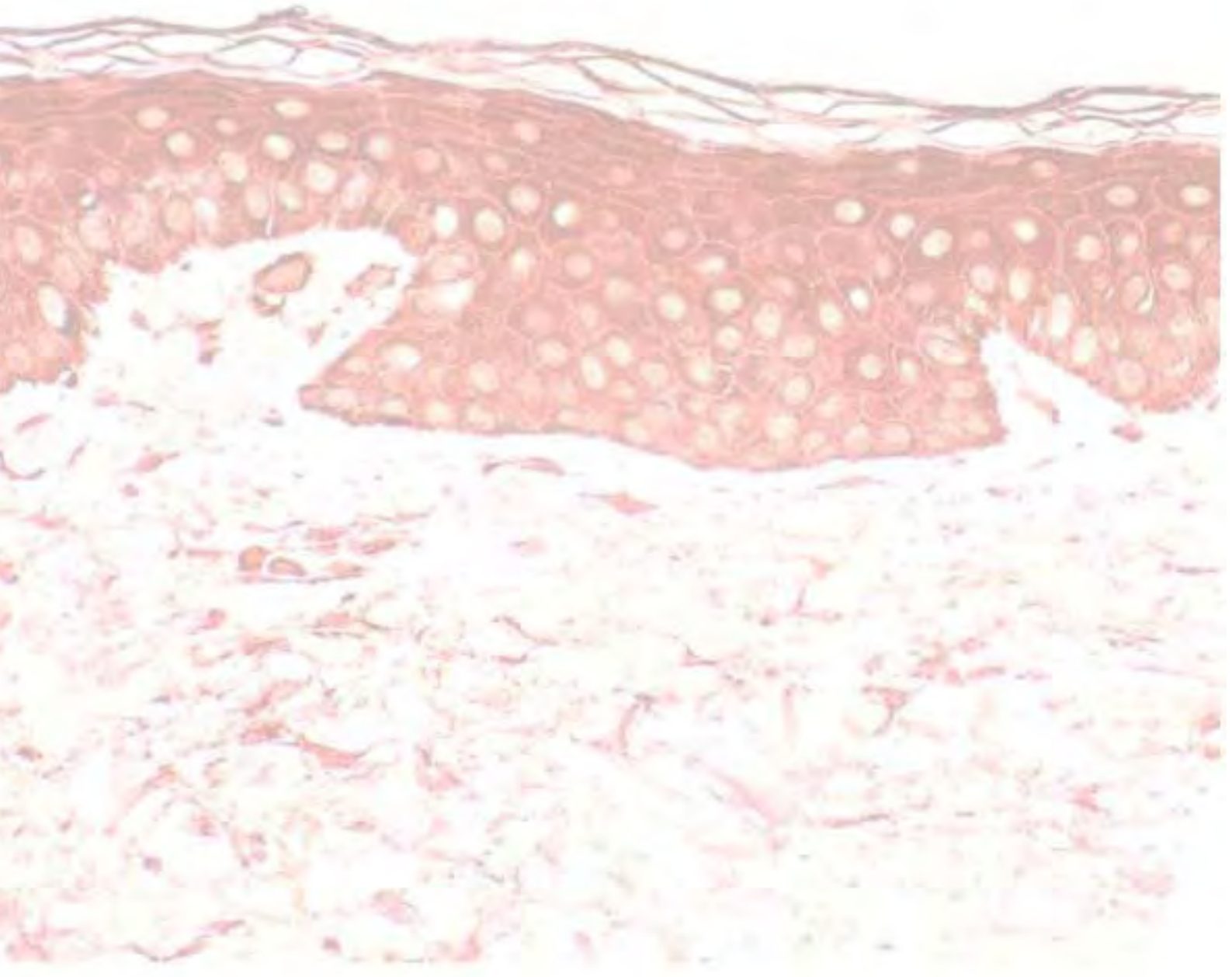
54 Jee SH, Lee SY, Chiu HC et al. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1407-12.

55 Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 96-110.

56 Loir B, Perez Sanchez C, Ghanem G et al. Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semiquantitative RT-PCR study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45: 1083-92.

57 Binneck E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2004; 32: 28-37.

Capítulo VI - Considerações Finais



PERSPECTIVAS

Melasma é uma doença freqüente na população geral, que gera grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e movimenta grandes esforços da pesquisa clínica e farmacêutica no desenvolvimento de tratamentos. Entretanto, o conhecimento relacionado a sua fisiopatogenia ainda é muito limitado.[1,2]

O presente estudo identificou maior dano solar e inflamação na epiderme com melasma, assim como a pigmentação mais intensa em decorrência de uma maior atividade melanocítica focal. A identificação de níveis aumentados de α-MSH e MC1-R epidérmicos sugere um envolvimento parácrino no controle da pigmentação local e lança argumentos para a investigação da participação dos ceratinócitos no processo fisiopatogênico do melasma.

Outros estudos devem ser conduzidos no caminho da elucidação dos diversos elementos envolvidos na fisiopatogenia do melasma, uma vez que somente a diferença quantitativa no MC1-R não seria uma única explicação para a real fisiopatogênese do melasma, diante da imensa quantidade de fatores envolvidos.

Investigação dos receptores de estrogênio na epiderme e nos melanócitos das peles sã e lesada seria esclarecedora quanto ao papel de hormônios esteróides sexuais no processo da hiperpigmentação localizada da doença.[3-7]

Pesquisa de variantes alélicas do MC1-R que se expressem diferentemente na pele sã e lesada poderiam justificar a pigmentação mais efetiva em certas áreas fotoexpostas do que em outras.[8-10]

Cultura de ceratinócitos e melanócitos de pele sã e com melasma e de populações não acometidas pela doença, sob diferentes regimes de exposição, permitiria um estudo comparativo da expressão de diversos genes para demonstrar as bases do comportamento fenotípico diferente desses grupos de células adjacentes no mesmo tecido.[11,12]

A experimentação clínica com proteínas AGOUTI em lesões de melasma, que competem com α-MSH nos receptores de MC1-R, poderia gerar subsídios fisiopatológicos para a compreensão do papel do sistema α-MSH/MC1-R na fisiopatogenia da doença.[13,14]

Perfis de citocinas melanogênicas expressas nas peles lesada e sã, assim como as células de origem, as decorrências locais e os estímulos desencadeantes

permitiriam uma compreensão dos elementos envolvidos na gênese do melasma.[14-17]

Enfim, estudos epidemiológicos de base populacional ou de subgrupos de pacientes com melasma, como gestantes, mulheres pós-menopausa ou homens podem contribuir na elaboração de novas hipóteses sobre a história natural e fisiopatogênese da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 96-101.

2 Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol* 2003; 149: 572-7.

3 Pache M, Glatz-Krieger K, Sauter G et al. Expression of sex hormone receptors and cell cycle proteins in melanocytic lesions of the ocular conjunctiva. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244: 113-7.

4 Matsumura R, Takeuchi S, Takahashi S. Effect of estrogen on melanocortin-3 receptor mRNA expression in mouse pituitary glands in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 143-51.

5 Chowers I, Livni N, Frucht-Pery J et al. Immunostaining of the estrogen receptor in conjunctival primary acquired melanosis. *Ophthalmic Res* 1999; 31: 210-2.

6 Jee SH, Lee SY, Chiu HC et al. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1407-12.

7 Sawaya ME, Garland LD, Rothe MJ et al. Oestrogen and progesterone receptors in lentigo maligna. *Br J Dermatol* 1988; 118: 69-71.

8 Motokawa T, Kato T, Hashimoto Y et al. Effect of Val92Met and Arg163Gln variants of the MC1R gene on freckles and solar lentigines in Japanese. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 140-3.

9 Naysmith L, Waterston K, Ha T et al. Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 423-8.

10 Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N et al. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1701-8.

11 Carroll L, Voisey J, van Daal A. Gene polymorphisms and their effects in the melanocortin system. *Peptides* 2005; 26: 1871-85.

12 Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 2003; 37: 67-90.

13 Carlson JA, Linette GP, Aplin A et al. Melanocyte receptors: clinical implications and therapeutic relevance. *Dermatol Clin* 2007; 25: 541-57, viii-ix.

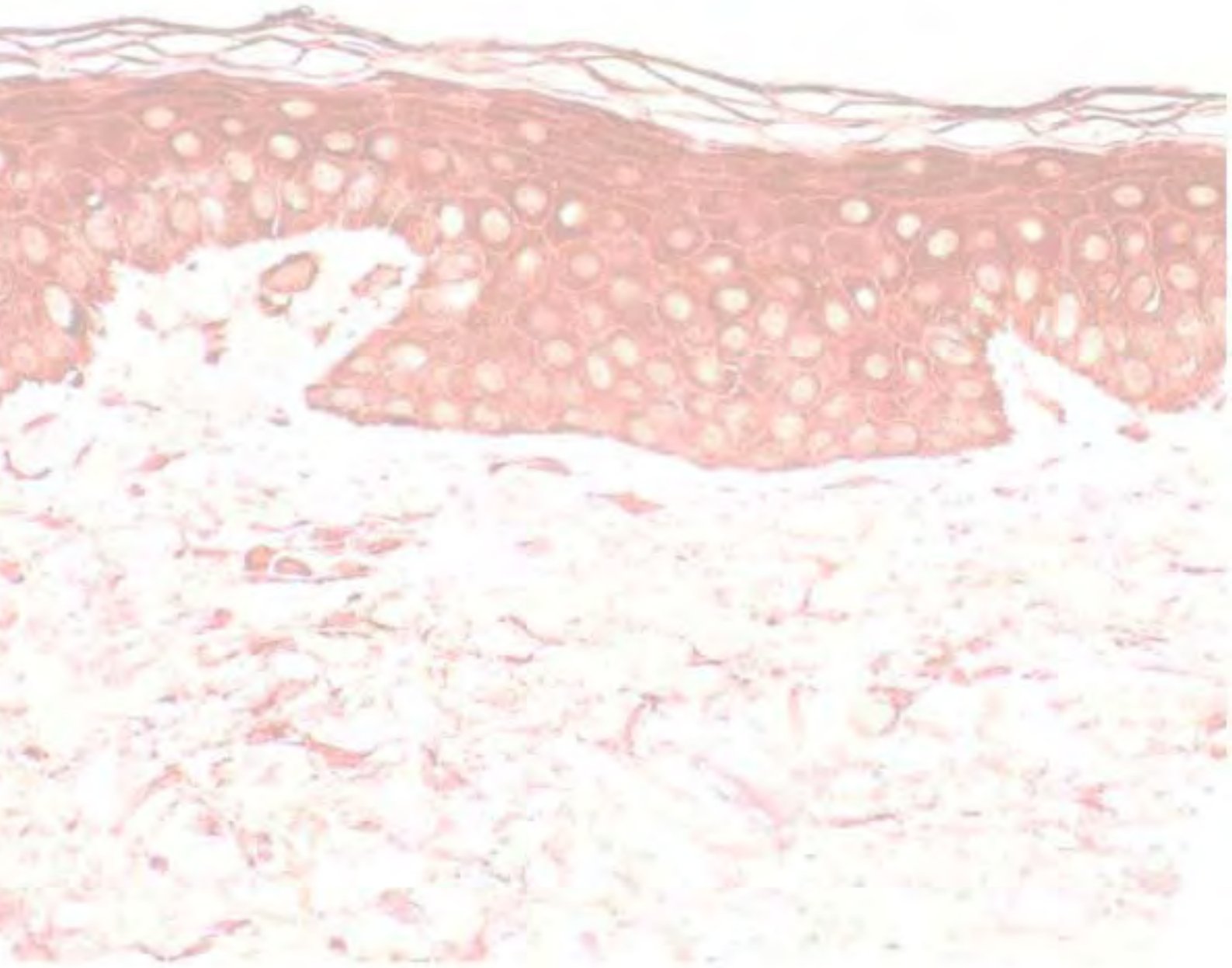
14 Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 96-110.

15 Kang HY, Hwang JS, Lee JY et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol* 2006; 154: 1094-9.

16 Sriwiriyanont P, Ohuchi A, Hachiya A et al. Interaction between stem cell factor and endothelin-1: effects on melanogenesis in human skin xenografts. *Lab Invest* 2006; 86: 1115-25.

17 Tada A, Suzuki I, Im S et al. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 575-84.

Anexos



Anexo I

PROTOCOLO DE PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA EM MELASMA

Responsável: Profa. Luciane Bartoli Miot

Cole a etiqueta ou Preencha

RG: .....
Nome: .....
Sexo: □ M □ F
Data de Nascimento:..... /..... /.....

Telefone para Contato:.....
Procedência (Cidade): .....
Naturalidade (Cidade): .....
Profissão: .....

Fototipo: □ I □II □ III □IV □V □VI Já Morou: □Praia □Sítio/Fazenda

Locais acometidos: □Parotídea □Zigoma □Temporal □Frontal □Glabela □Mandibular □Labial

Superior □Mento □Nasal □Cervical □MMSS □Colo □Orelhas □Outro

Início do Melasma: ..... anos de idade
História Familiar de Melasma: □Não □Sim Quem? .....

Fator desencadeante: □ACO □Gestação □Menopausa □TRH

□Estresse psicológico □Infecção □Outro

Tabagismo? □Não □Sim - (Atual: □Não □Sim)

Usa filtro solar? □Não □Sim - Qual? .....

Uso diário: □Não □Sim
Há quanto tempo? .....
Usa ACO? □ Não □ Sim – Qual? .....
Há quanto tempo? .....
Usa outros medicamentos?.....
.....
.....
Comorbidades? .....
.....

GESTA:..... PARTOS: ..... AB: .....

Tratamentos já realizados	Sucesso/Insucesso

TSH: ..... Cortisol basal: .....
Comentários: (No verso)

Anexo II

Aprovação do projeto no CONEP

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 26 de fevereiro de 2.004

OF.29/2004-CEP
MACAH/asc

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Mariângela Esther Alencar Marques
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Profª. Mariangela ,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, estou enviando Parecer nº 293/2004-CONEP, referente ao Projeto de Pesquisa ***"Estudo morfofuncional e expressão de MC-1R nos melanócitos de lesões de melasma"****, de autoria de Luciane Donida Bártoli Miot, orientada por Vossa Senhoria.*

Situação do Projeto: Aprovado

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo III

Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA E RADIOTERAPIA

Unesp

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa intitulada "Estudo morfofuncional e expressão do MC-1R nos melanócitos de lesões de melasma" tem como objetivo esclarecer algumas características da doença de pele denominada melasma. Para realização da pesquisa, na primeira consulta, serão retirados, sob anestesia local, 2 fragmentos de 2 mm cada da pele dos pacientes portadores de melasma, utilizando-se um "punch" (um tipo de bisturi). Os fragmentos serão obtidos tanto da pele comprometida pela mancha, quanto da pele sadia ao redor, para compararmos as regiões. O desconforto da anestesia empregada se restringe a dor e ardência passageiros e os riscos da biópsia são de infecção local, sangramento discreto e formação de pequena cicatriz. Vale ressaltar que a realização da biópsia não é necessária para o tratamento e tem apenas importância científica. O paciente que apresentar quaisquer complicações receberá orientações e tratamentos adequados por parte da responsável pela pesquisa. É necessário esclarecer ainda, que não haverá benefícios imediatos aos participantes desse projeto.

Eu ....., após ser devidamente esclarecida, inclusive sobre o risco de pequena cicatriz, aceito participar do projeto de pesquisa, podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar e autorizo a retirada de fragmentos da minha pele. Também fui informada que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Botucatu, ... de ..... de 2008.

_____
Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador:

_____
Dra. Luciane Donida Bartoli Miot
Dermatologista – CRM 90420
Endereço: Rua Marechal Fernandes Cardoso, 690
Vila Santa Luzia – Botucatu – SP
Telefone: (14) 3813-2381

Campus Universitário da Unesp Botucatu-SP CEP18618-000 Fone:14 3811 6015/6087 FAX:14 3882 4922 e-mail: dermato@fmb.unesp.br

Anexo IV

Macros do ImageJ 1.38x para análise digital

1. Detecção e contagem de partículas equivalentes a linfócitos na derme

```
macro "Linfocito [4]" {
run("Crop");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("RGB Split");
close();
close();
run("A posteriori shading correction 514 v3", "automatic initial_x=0 initial_y=0
number_of_points_on_x=10 number_of_points_on_y=10 x_degree=2 y_degree=2");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("8-bit");
run("k-means Clustering ...", "number=4 cluster=0.00010000 enable randomization=48
show");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Make Binary");
run("Restore Selection");
run("Close-");
run("Invert");
}

macro "Contar [5]" {
run("Analyze Particles...", "size=35-400 circularity=0.40-1.00 show=Ellipses clear
summarize");
run("8-bit");
run("Histogram");
run("Put Behind [tab]");
run("Put Behind [tab]");
close();
}
```

2. Análise da densidade de melanina na epiderme

```
macro "Fontana [3]" {
run("Crop");
run("Clear Outside");
run("Select All");
run("A posteriori shading correction 514 v3", "automatic initial_x=0 initial_y=0
number_of_points_on_x=10 number_of_points_on_y=10 x_degree=2 y_degree=2");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5 equalize");
```

```
run("Invert");
run("Select All");
run("k-means Clustering ...", "number=3 cluster=0.00010000 enable randomization=48
show");
run("Invert");
run("Histogram");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
}
```

3. Análise da densidade de melanócitos na epiderme

```
macro "Melan [2]" {
run("Crop");
run("Select All");
run("A posteriori shading correction 514 v3", "automatic initial_x=0 initial_y=0
number_of_points_on_x=10 number_of_points_on_y=10 x_degree=2 y_degree=2");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("k-means Clustering ...", "number=4 cluster=0.00010000 enable randomization=48
show");
run("Make Binary");
run("Invert");
run("Analyze Particles...", "size=150-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Ellipses
display exclude clear");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
}
```

4. Macro da análise da intensidade de imunomarcação de MC1-R na epiderme

```
macro "MC1R [1]" {
run("RGB Split");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("8-bit");
run("Select All");
run("A posteriori shading correction 514 v3", "automatic initial_x=0 initial_y=0
number_of_points_on_x=10 number_of_points_on_y=10 x_degree=2 y_degree=2");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Invert");
run("Subtract Background...", "rolling=200");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
}
```

5. Macro da análise da intensidade de imunomarcação de α-MSH na epiderme

```
macro "MSH [1]" {
run("RGB Split");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
run("8-bit");
run("Select All");
run("A posteriori shading correction 514 v3", "automatic initial_x=0 initial_y=0
number_of_points_on_x=10 number_of_points_on_y=10 x_degree=2 y_degree=2");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Invert");
run("Subtract Background...", "rolling=200");
run("Put Behind [tab]");
close();
run("Put Behind [tab]");
close();
}
```

Anexo V

Solicitação de alteração do título do projeto

Fls. .....
Proc. .....
Rub. .....

unesp
DIVISÃO TÉCNICA ACADÊMICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Seção de Pós-Graduação

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - PABX (0xx14) 3811-6022

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa : "Estudo Morfofuncional e expressão de MC-R1 nos melanócitos de lesões de melasma" aprovado pelo CONEP em 16/02/2004 e pelo CEP em 26/02/2004, teve seu título alterado para " Estudo Comparativo Morfofuncional e Expressão de Receptor de Melanocortina do tipo 1 em Lesões de Melasma", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Defesa de Tese de Doutorado.

Comitê de Ética em Pesquisa
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Recebi aos 29/01/08
Alberto Antonio Capellupp
Secretário CEP/CEEA

Botucatu, 29/01/2008

Nome/Assinatura do(a) aluno(a:Luciane Donida Bartoli Miot.

Nome/Assinatura do(a) orientador (a): Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques.

Programa de Pós Graduação em Patologia