



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos

**Estudo histomorfométrico, ultraestrutural e da expressão
de Wnt1, WIF-1 e ASIP na pele com melasma em
comparação com a pele sã perilesional e retroauricular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

**Botucatu
2017**

Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos

Estudo histomorfométrico, ultraestrutural e da expressão de Wnt1, WIF-1 e ASIP na pele com melasma em comparação com a pele sã perilesional e retroauricular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lemos, Ana Cláudia Cavalcante Espósito.

Estudo histomorfométrico, ultraestrutural e da expressão de Wnt1, WIF-1 e ASIP na pele com melasma em comparação com a pele sã perilesional e retroauricular / Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Hélio Amante Miot

Capes: 40105008

1. Melanose. 2. Imunofluorescência. 3. Microscopia eletrônica de transmissão. 4. Histologia.

Palavras-chave: Histologia; Imunofluorescência direta; Melanose; Melasma; Microscopia eletrônica de transmissão.

Dedicatória:

A minha família

Ao meu marido, Felipe,

Por ser meu grande companheiro e incentivador - não só na pós-graduação, mas na vida. Estava ao meu lado quando passei no vestibular da gloriosa Medicina Unesp. Foi ele quem me acompanhou à prova de Residência e quem viu pela primeira vez o meu Título de Especialista. Na pós-graduação não poderia ser diferente: conhece com detalhe todos os resultados do nosso estudo e certamente estará, com seu olhar atento, no dia da defesa. Acho que só me resta agradecer...

Aos meus pais, Ione e Wagner,

Por sempre acreditaram que a Educação era o melhor caminho. Minha mãe, grande exemplo e motivo de orgulho, também mergulhou no universo da Pós-Graduação mesmo após muitos anos de profissão. Meu pai, meu grande torcedor, sempre nos ensinou a importância da dedicação e da persistência.

A minha irmã, Maria Clara,

Por vivenciar a saudade diária imputada pela distância física, mas sempre acreditando que seria para um bem maior.

Agradecimento especial:

A Deus,

Por guiar nossa caminhada e permitir que este trabalho fosse ainda mais instigante do que eu conseguia - racionalmente - imaginar previamente.

Ao meu grande orientador, Hélio Amante Miot,

Por seu amor incondicional ao conhecimento. Por ser um pesquisador incansável e um dermatologista exemplo. A mim, só cabe agradecer: pela preocupação constante com o projeto, pelo aprendizado semanal nas reuniões e pelas oportunidades.

Agradecimentos

Às pacientes participantes do estudo,

Por acreditarem na seriedade do nosso projeto e efetivamente doarem uma parte de si para que ele fosse possível.

À Dra. Luciane Miot,

Por permitir que realizássemos as biópsias em seu ambulatório. Por suas grandes contribuições científicas à compreensão da fisiopatologia do melasma e por todo auxílio na concepção/execução deste estudo.

Aos docentes, médicos contratados, médicos colaboradores, funcionários, biólogas, fotógrafa e médicos residentes do Departamento de Dermatologia e Radioteria da Faculdade de Medicina de Botucatu,

Pelos ensinamentos que vão além da dermatologia.

A minha banca de qualificação, Dra. Luciana Abbade e Dr. Juliano Schimitt,
Pela leitura atenta e contribuições fundamentais ao texto final.

Ao funcionário do Laboratório Toxican, Paulo,

Pela confecção de todos nossos blocos de parafina e pela constante torcida.

À Gabrielli Brianezi,

Por ser um exemplo de orientada e de pesquisadora. Pelas horas sobre a bancada me ensinando os primeiros passos da complexa Imunofluorescência Direta.

À Nathália Souza,

Pelos feriados e finais de semana que passamos trabalhando no laboratório. Por toda disponibilidade em estudar uma área que não é a sua linha de pesquisa e, acima disto, pela amizade que surgiu.

À fotógrafa, Eliete Soares,

Pelos seus registros através das lentes.

Aos meus amigos, Marília, Luiz Antônio, Ana Paula, Andrea, Bruno, Julcy, Marcela, Maria Laura, Giovanna, Lívia, Priscilla, Mariana, Eliete, Sérgio Gouveia,

Por me receberem em suas casas durante as disciplinas. Pelos almoços às quintas-feiras; por ouvirem as angústias inerentes à pós-graduação. Por lerem o manuscrito e por me fazerem acreditar que, no fim, o resultado seria feliz.

À secretária do programa de pós-graduação em Patologia, Vânia Soler,

Por toda atenção e solicitude.

Ao Fundo de apoio à Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio (FUNADERSP),

Pelo fomentando à pesquisa na dermatologia. Sem ela, este projeto não se concretizaria.

Resumo:

O melasma é hipermelanose crônica e adquirida decorrente de um complexo processo que envolve hipertrofia melanocítica e disfunção melanogênica. Acomete preferencialmente o sexo feminino e as lesões ocorrem nas áreas fotoexpostas, especialmente a face. Sua patogênese não é bem compreendida e os estudos clássicos avaliam apenas pele acometida e perilesional, mas pouco se sabe do comportamento da pele fotoprotetida, submetida aos mesmos fatores sistêmicos e genéticos. Neste estudo, objetivamos avaliar características histológicas, vias epidérmicas que influem na melanogênese (Wnt e ASIP) e características ultraestruturais da pele com melasma em comparação com a pele são adjacente e retroauricular. Para a execução deste estudo transversal com controle intra-sujeito, foram coletadas três biópsias cutâneas (*punch* 3 mm) de onze mulheres com melasma facial. As áreas de coleta foram a pele com melasma, pele são adjacente (distanto no máximo 2 cm do limite da lesão) e pele retroauricular ipsilateral. Os fragmentos provenientes de dez participantes foram corados por hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff, Fontana-Masson, picrosírio *red*, azul de toluidina e Verhóff; imunomarcados para CD34 e submetidos à imunofluorescência direta (IFD) de dupla marcação para proteínas Wnt1, WIF-1 e ASIP. Já os três fragmentos de uma das participantes foram processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os dados obtidos foram comparados entre as topografias por modelo linear generalizado de efeitos mistos. As participantes eram fototipo III ou IV de Fitzpatrick, com idade média (desvio-padrão) de 42,9 (8,9) anos e apresentavam lesões há 16,7 (7,9) anos. Houve adelgaçamento da camada córnea na pele com melasma e na pele adjacente. Na pele com melasma houve maior compactação da córnea, maior pigmentação melânica epidérmica, maior heterogeneidade do colágeno, elastose solar, maior número de mastócitos, falhas da integridade da zona da membrana basal, melanócitos em pêndulo, bem como maior celularidade e vasos na derme superficial. IFD evidenciou maior intensidade de marcação de Wnt1 na pele com melasma em relação à pele adjacente e maior intensidade na pele retroauricular em relação à pele são adjacente. Não houve diferença estatística significativa na intensidade de marcação de WIF-1 e ASIP entre as topografias. À MET, houve maior dano estrutural na lâmina lúcida no melasma, bem como maior número de melanossomas maduros e organelas citoplasmáticas nos melanócitos e queratinócitos basais. Tais resultados evidenciam que a pele com melasma apresenta, além da hipertrofia melanocítica, alterações na barreira epidérmica, na derme superior, zona de membrana basal e maior ativação da via Wnt, que diferem da pele fotoexposta adjacente e da retroauricular, configurando um fenótipo individualizado e não somente uma extensão do fotoenvelhecimento ou do envelhecimento intrínseco.

Palavras-chave: Melasma; Microscopia Eletrônica; Histologia; Luz Solar; Raios Ultravioletas; Colágeno; Melanose; Melanócitos; Melanossomas; Técnica Direta de Fluorescência para Anticorpo; Imunofluorescência.

Abstract

Melasma is a chronic and acquired hypermelanosis resulting from a complex process which involves melanocytic hypertrophy and melanogenic dysfunction. Melasma mainly affects females and lesions occur in the photoexposed areas, especially the face. Its pathogenesis is not well understood, and classical studies evaluate only the affected and perilesional skin, but little is known about the behavior of the non-sun-exposed skin, subjected to the same systemic and genetic factors. In this study, we aimed to evaluate histological features, epidermal pathways that influence melanogenesis (Wnt and ASIP) and ultrastructural characteristics of the skin with melasma in comparison to healthy adjacent and retroauricular skin. For the execution of this cross-sectional study with intrasubject control, three skin biopsies (punch 3 mm) were collected from eleven women with facial melasma. The areas of collection were the skin with melasma, adjacent healthy skin and retroauricular skin. Fragments from ten participants were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid from Schiff, Fontana-Masson, picrosirius red, toluidine blue and Verhöff; immunomarked for CD34 and subjected to double-labeled direct immunofluorescence (DIF) for Wnt1, WIF-1 and ASIP proteins. The three fragments of one of the participants were processed for Transmission Electron Microscopy (TEM). The data obtained were compared between topographies by generalized linear model of mixed effects. Participants were Fitzpatrick's phototype III or IV; the mean age (standard deviation) was 42.9 (8.9) years and they had lesions for 16.7 (7.9) years. There was thinning of the corneal layer on the skin with melasma and adjacent skin. In the skin with melasma, there was more corneal compaction, greater epidermal melanic pigmentation, greater collagen heterogeneity, solar elastosis, more mast cells, defects of the basement membrane area, pendulum melanocytes, as well as greater cellularity and vessels in the superficial dermis. DIF showed a greater intensity of Wnt1 marking in the skin with melasma in relation to the adjacent skin, and greater intensity in the retroauricular skin in relation to the adjacent healthy skin. There was no significant statistical difference in the intensity of WIF-1 and ASIP marking between topographies. At TEM, there was more structural damage to the lamina lucida in melasma, as well as more mature melanosomes and cytoplasmic organelles in melanocytes and basal keratinocytes. These results show that melasma skin presents, in addition to melanocytic hypertrophy, alterations in the epidermal barrier, upper dermis, basement membrane zone and greater activation of the Wnt pathway, which differ from adjacent and retroauricular photoexposed skin, forming an individualized phenotype and not only an extension of photoaging or intrinsic aging.

Key-words: *Melasma; Microscopy, Electron; Histology; Sunlight; Ultraviolet Rays; Collagen; Melanosis; Melanocytes; Melanosomes; Fluorescent Antibody Technique, Direct; Fluorescent Antibody Technique.*

Lista de abreviaturas / Siglas

α MSH - hormônio estimulador de melanócito alfa
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
ASIP - *agouti signaling protein*
correceptor Lrp - proteína relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade
DIF - *direct immunofluorescence*
DLQI - *Dermatology Life Quality Index*
FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu
Fzd - receptor Frizzled
GSK-3 - *glicogen sintase kinase-3*
IFD - imunofluorescência direta
iNOS - óxido nítrico sintetase induzida
JNK - N-terminal c-Jun
LIP - Luz Intensa Pulsada
MASI - *Melasma Area and Severity Index*
MC1-R - receptor de melanocortina 1
MELASQoL - *Melasma Quality of Life Scale*
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
MITF - fator de transcrição da microftalmia
mMASI - MASI modificado
MMP - metaloproteinase
NGF - fator de crescimento de nervo
PAS - ácido periódico de Schiff
PDL - *Pulsed Dye Laser*
POMC - peptídeos derivados da clivagem da proopiomelanocortina
PPAR - receptor alfa do ativador da proliferação de peroxissomo
QS-Nd:YAG - *Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet*
RUV - radiação ultravioleta
SCF - fator estimulador de *stem cell*
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM - *Transmission Electron Microscopy*
TRP-1 - proteína relacionada à tirosinase 1
TSH - hormônio tireoestimulante
UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular
WIF-1 - fator 1 inibidor de Wnt
Wnt/ β catenina - via canônica do Wnt
ZMB - zona de membrana basal

Sumário

Revisão da literatura.....	12
Objetivos	36
Artigo principal	37
Conclusões.....	62
Perspectivas	63
Anexo 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	64
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	66
Anexo 3: Análise quantitativa de imagem e avaliações qualitativas	67
Anexo 4: Controles positivos das IFD	69

Revisão da literatura

Melasma é hipermelanose crônica adquirida decorrente de um processo complexo que envolve hipertrofia melanocítica e disfunção melanogênica.(1)

A palavra melasma provém do grego “*melas*” que significa preto, fazendo referência à coloração acastanhada das lesões dermatológicas.(1,2)

EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO:

No ano de 2006, a Sociedade Brasileira de Dermatologia publicou um estudo sobre o perfil nosológico das consultas dermatológicas no País: as desordens pigmentares, segundo esse levantamento, corresponderam a 8,4% das 57.343 consultas registradas, sendo, portanto, a terceira causa em procura por atendimento especializado.(3)

Já em 2010, em outro estudo brasileiro realizado com 1.500 adultos de diferentes estados, os distúrbios da pigmentação foram a principal causa isolada para consulta com dermatologista, tanto em homens quanto mulheres, correspondendo a 27,6% dos atendimentos.(4)

A incidência populacional do melasma não é conhecida de forma precisa;(1) além disso, varia conforme a composição étnica da população estudada e com a incidência solar local, sendo mais prevalente nas regiões tropicais e em indivíduos de maior fototipo de Fitzpatrick.(5-7) Há predominância entre as populações do Leste da Ásia, Oriente Médio, Índia, África Mediterrânea, entre hispano-americanos e brasileiros.(6,8,9) No Brasil, estima-se que acometa 15-35% das mulheres adultas.(10)

Melasma é mais frequente em mulheres, sendo que a relação entre os sexos varia conforme a população estudada. Em Porto Rico, o sexo masculino representa 10% dos indivíduos com melasma.(11) Já na Índia, 20%-25% dos indivíduos do sexo masculino que foram estudados tinham melasma.(12,13) No Brasil, Hexsel e colaboradores avaliaram 953 indivíduos com melasma e apenas 2,5% deles eram homens.(14)

Em geral, o melasma tem início durante o menacme, entre a segunda e quarta década de vida, o que sugere uma possível influência hormonal em seu desencadeamento.(7,12)

Os fototipos mais acometidos são os de III a V de Fitzpatrick, contabilizando até 88% dos casos.(5,7,14) Indivíduos de fototipos extremos (I e VI) raramente desenvolvem as lesões. Para alguns autores, isso decorre da estabilidade pigmentar desses grupos e explicaria a pequena quantidade de casos dentre a população europeia de pele clara e entre os negroides

subsaarianos.(1)

História familiar é comum no melasma. No Brasil, 40-60% dos pacientes têm antecedente familiar positivo.(1,15) Já na Índia, Achar e colaboradores identificaram percentual de 33,3%.(12)

Estudos sugerem que a idade de início do melasma se correlaciona com o fototipo e a presença de história familiar positiva. Pacientes com fototipos II e III e história familiar de melasma têm início mais precoce das lesões cutâneas quando comparados com os fototipos IV, V e VI, bem como quando comparados a pacientes sem história familiar de melasma.(7,14)

Apesar de sua etiologia não ser conhecida, muitos são os desencadeantes já estudados.(12,16) O surgimento das lesões e a manutenção das mesmas depende da interação entre fatores ambientais, hormonais e susceptibilidade genética.(5)

Exposição solar é o principal fator de risco para melasma. Guinot e colaboradores, ao estudarem 197 tunisianos com melasma, identificaram que a fotoexposição foi o desencadeante em 51% das mulheres e fator agravante em 84%.(17) A radiação ultravioleta é capaz de aumentar a atividade melanogênica e transferência de melanossomas (inclusive com maior proporção de eumelanina), o que ocorre com mais intensidade nas áreas com melasma do que na pele sã perilesional, simulando um fototipo maior na área localizada do que na pele sã ao redor.(1,7)

Uso de contraceptivo oral e gestação são outros desencadeantes conhecidos. Lesões que tiveram início durante gestação estão associadas a início mais precoce da doença; são mais comuns em pacientes com múltiplas gestações, porém, não se relacionam a nenhum padrão clínico específico.(7) Dois terços das pacientes que desenvolvem melasma durante a gestação apresentam desaparecimento das lesões, já aquelas cujo melasma foi desencadeado pelo uso hormonal oral não tendem a desaparecer após suspensão do contraceptivo.(7,18–20)

Mulheres com melasma apresentam menor nível educacional do que mulheres sem melasma, o que pode se relacionar à falta de informação sobre fotoproteção, dificuldades financeiras em comprar fotoprotetores e maior exposição laboral à radiação ultravioleta em trabalhos que exigem menores níveis de instrução acadêmica.(21)

A população brasileira tem elevada miscigenação genética: seus três principais grupos ancestrais os europeus colonizadores, escravos africanos e ameríndios nativos.(3) Um estudo transversal brasileiro avaliou 119 mulheres com melasma facial e 119 mulheres sem melasma (grupo controle) pareadas pela idade. Foi coletada amostra da mucosa oral de ambos os grupos para extração de DNA.(21) O estudo evidenciou que a ancestralidade africana está relacionada, independentemente de outros fatores de risco, ao desenvolvimento de melasma facial em

mulheres brasileiras.(21)

Tamega e colaboradores identificaram alteração na dosagem sérica de TSH (hormônio tireoestimulante) em 25,3% das 302 mulheres com melasma avaliadas, bem como alteração em 9,6% das mulheres quanto ao cortisol. Entretanto, esses achados não diferem da prevalência habitual para mulheres na faixa etária avaliada.(7,22)

Como o advento de novas drogas e com a ampliação do uso de outras já pré-existentes, a literatura tem acumulado relatos de melasma desencadeados por novos medicamentos. Agentes fototóxicos, fenotiazinas e anticonvulsivantes podem ser desencadeantes da doença.(23) A fisiopatologia do melasma induzido por droga pode envolver diferentes mecanismos, como aumento da síntese e deposição de melanina, inflamação cutânea e dano vascular dérmico.(24)

Cerca de 10% dos pacientes que fazem uso de fenitoína desenvolvem melasma, devido efeito direto da droga no melanócito, gerando dispersão dos grânulos de melanina e induzindo pigmentação da camada basal; sendo que as lesões em geral desaparecem após suspensão da droga.(20) Ghunawat, Sarkar e Garga relataram cinco casos de lesões melasma-*like* desencadeados pelo uso de imatinibe (inibidor da tirosina quinase que tem como alvo a região BCR-ABL) em pacientes em tratamento para leucemia mieloide e tumor estromal gastrointestinal;(25) em revisão da literatura, os autores identificaram apenas 18 casos semelhantes.(25) Clomipramina, um antidepressivo tricíclico, também foi relatado em dois casos como desencadeante de lesões de melasma.(26,27)

Os cosméticos também são desencadeantes possíveis.(28) Em um estudo indiano que envolveu 67 indivíduos com melasma de ambos os sexos, 29 (43,2%) apresentaram teste de contato positivo para componentes químicos dos cosméticos.(23) Para os autores, evitar os cosméticos que desencadeiam dermatite de contato pigmentada pode ser um passo importante no tratamento de pacientes com melasma.(23)

Tamega e colaboradores identificaram o estresse como desencadeante em 6,6% do grupo estudado.(7) Uma possível via decorre dos hormônios ACTH e MSH (hormônio estimulador de melanócito) que são liberados nas situações de estresse e podem ativar os receptores de melanocortina dos melanócitos, induzindo melanogênese.(29)

Em homens, o melasma também apresenta uma influência genética.(30,31) Vazquez e colaboradores relataram que 70,4% dos homens com melasma estudados tinham história familiar de melasma em parentes de primeiro ou segundo grau.(32) A fotoexposição também é desencadeante importante no gênero masculino.(32,33) Sarkar e colaboradores evidenciaram maior fotoexposição dentre o grupo de homens indianos com melasma.(25) Alguns autores

acreditam que haja uma resistência hormonal testicular sutil permeando a patogênese do melasma em homens, tendo em vista níveis significativamente maiores de hormônios luteinizantes e níveis significativamente menores de testosterona em quinze indianos do sexo masculino com melasma, em comparação com onze controles do sexo masculino pareados por idade e sem melasma.(34)

LESÕES CLÍNICAS:

Clinicamente, as lesões são máculas acastanhadas a enegrecidas, de distribuição simétrica, formato irregular e limites nítidos.(14)

As lesões acometem apenas áreas fotoexpostas.(33) A face é a localização mais prevalente (melasma facial), mas podem ocorrer lesões extrafaciais (tórax anterior, braços e antebraços).(2) Os autores, em geral, subdividem o melasma facial quanto à região de acometimento em: a) centrofacial (lesões frontais, nasais, mentonianas e zigoma); b) periférico e c) combinado (lesões centrofaciais e periféricas). Tamega e colaboradores demonstraram ser o padrão combinado (Figura 1) o mais comum dentre as mulheres com melasma facial, seguido pelo padrão centrofacial.(7)



Figura 1. Melasma facial combinado (arquivo do pesquisador).

No estudo de Hexsel e colaboradores, as regiões da face mais acometidas pelo melasma foram: malar (90,1% dos pacientes em estudo), frente (53,3%) e supralabial (52,2%)(14). Neste mesmo estudo, as mulheres pós-menopausa apresentavam maior ocorrência de lesões extrafaciais (membros superiores) associada à lesão facial em comparação com mulheres não menopausadas (14.2% vs. 3.5%); entretanto, o estudo foi transversal, não se podendo inferir sobre mudanças no padrão de distribuição das lesões no período pós-menopausa.(14)

Classicamente, o melasma era dividido entre epidérmico, dérmico e misto quanto à profundidade de seu pigmento por meio da avaliação sob a lâmpada de Wood. O melasma epidérmico corresponderia àquele no qual o pigmento se encontra na camada basal ou suprabasal; o dérmico teria pigmento em meio a melanóforos da derme superficial e média; já o misto seria a combinação dos dois tipos anteriores. Entretanto, esta classificação está em desuso, tendo em vista não ser um método de alta acurácia ao comparar com a real profundidade do pigmento ao exame histopatológico, tampouco porque a diferença da quantidade de melanina dérmica entre pele lesada e pele sã adjacente não mostra diferença na maior parte dos estudos.(33) A lâmpada de Wood pode, porém, prever a resposta terapêutica do melasma, mais favorável aos casos avaliados como “epidérmicos”.(35)

Apesar do diagnóstico de melasma não imputar, em geral, dificuldade ao dermatologista, a dermatoscopia e microscopia confocal também podem ser ferramentas de auxílio. À dermatoscopia (Figura 2), as lesões apresentam padrão reticular de pigmentação com diferentes tons acastanhados que poupam as aberturas foliculares.(33) Já à microscopia confocal, pode-se visualizar elastose solar e aumento dos vasos sanguíneos dérmicos na pele com melasma, bem como a distribuição heterogênea dos melanóforos entre diferentes regiões,(36) o que pode permitir ao dermatologista prever a resposta clínica ao tratamento.(33,36)



Figura 2. Dermatoscopia da transição entre a pele com melasma facial e a pele adjacente saudável. A pigmentação do melasma é acastanhada, com padrão reticular que poupa as aberturas foliculares (arquivo do pesquisador).

Os principais diagnósticos diferenciais clínicos do melasma são efélides, lentigo solar, hiperpigmentação pós-inflamatória, ocronose, melanose de Riehl, nevo de Ota, mancha café-com-leite, poiquilodermia de Civatte.(1,37)

AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMPACTO NA QUALIDADE DE VIDA

O escore MASI (*Melasma Area and Severity Index*) foi proposto em 1994 por Kimbrough-Green e colaboradores para avaliar a gravidade do melasma facial. São avaliados: área afetada, hiperpigmentação e homogeneidade da pigmentação, sendo a face é dividida em quatro regiões para a avaliação (frontal, malar direita e esquerda, mento). O cálculo é feito por meio da inspeção visual e seu valor final decorre da soma dos escores da intensidade e homogeneidade da pigmentação, multiplicado pelo score de área e um fator multiplicador para cada região.(1,38) O MASI é a medida de avaliação de desfecho mais utilizada em estudos de melasma.(39)

Após 20 anos de sua descrição, o MASI foi submetido a um processo de validação, tendo sido eliminado o critério de homogeneidade como parte do score, o que resultou em um MASI modificado (mMASI).(38,39) Para o cálculo de mMASI, utilizam-se a avaliação de pigmentação e a área de envolvimento das quatro regiões da face. O mMASI (Quadro 1) é mais fácil de calcular em comparação ao MASI; há um excelente grau de concordância entre os dois

escores, sendo o mMASI confiável, válido e responsivo a mudanças na gravidade do melasma.(40)

Quadro 1. mMASI. Esquema de cálculo do índice de gravidade do melasma simplificado. O escore total varia de 0 a 24.(38–40)

	Intensidade de pigmentação*	Área Afetada**	Fator de multiplicação	Valor
Frontal	()	X	X	0,3
Malar Direita	()	X	X	0,3
Malar Esquerda	()	X	X	0,3
Mento	()	X	X	0,1
MASI			SOMA TOTAL	

*Categorias: 0 nenhuma, 1 leve, 2 média, 3 marcante e 4 máxima.

**Categorias: 0 pele normal; 1=< 10%; 2 =10%-29%; 3 =30-49%; 4 =50%-69%; 5 =70%-89%; 6 =90%-100%.

Qualidade de Vida Relacionado à Saúde descreve o bem-estar de um indivíduo relacionado às esferas físicas, sociais e psicológicas e avalia a interferência da doença no dia a dia.(41,42) Instrumentos genéricos como *Dermatology Life Quality Index* (DLQI) e SKINDEX-16 foram desenvolvidos para avaliar especificamente o impacto das doenças cutâneas.(42–44) Ambos os índices ponderam igualmente o sofrimento físico e psicológico decorrentes da condição dermatológica, o que não é adequado na avaliação do melasma, por exemplo, que tem maior interferência psicossocial do que física na vida do paciente.(42)

MELASQoL (*Melasma Quality of Life Scale*) foi um instrumento desenvolvido por Balkrishnan e colaboradores no ano de 2003 especialmente para avaliação dos pacientes com melasma.(42) Este índice é composto por questões mais específicas ao melasma e tem ênfase nos aspectos emocionais e psicossociais do paciente.(45) MELASQOL tem alta consistência interna, validade e poder discriminatório quando comparado ao DLQI e SKINDEX.(42) Tal índice consiste em 10 itens, pontuados de um a sete, sendo que scores mais altos indicam menor qualidade de vida.

No melasma, a gravidade clínica das lesões dermatológicas (avaliada pelo MASI) não apresenta alta correlação com as medidas psicométricas de sofrimento psíquico (como o MELASQOL), o que reitera o caráter subjetivo da percepção da doença.(45,46)

Apesar de as lesões serem assintomáticas, o acometimento de áreas visíveis, em mulheres em idade reprodutiva e economicamente ativa, associado às recidivas frequentes e dificuldade em tratamento gera significativo impacto na qualidade de vida das pacientes.(1,7,46) Há descrição de índices MELASQOL maiores dentre os pacientes com menores níveis educacionais, o que pode sinalizar para uma menor compreensão da dermatose e, portanto, maior nível de ansiedade e sofrimento.(47,48)

FISIOPATOLOGIA

A pele com melasma apresenta melanócitos maiores e com dendritos mais proeminentes, bem como aumento da melanina em todas as camadas da epiderme em comparação com a área perilesional.(49) Os melanossomas são mais proeminentes e, na derme papilar, a elastose solar é mais intensa.(49)

Diversos fatores autócrinos, parácrinos e mecanismos de adesão celular estão envolvidos na determinação da pigmentação cutânea e, quando desregulados, nas desordens pigmentares.(50) Apesar de a melanogênese do melasma ainda não ser completamente entendida, sabe-se que tem padrão fisiopatológico diferente do que ocorre nas efélides, lentigos solares e no bronzeamento.(21)

A radiação ultravioleta (RUV) é o principal fator ambiental que interfere na pigmentação do melasma. Ela induz a melanogênese tanto de forma indireta – através do estímulo à liberação de fatores melanogênicos pelos queratinócitos – quanto por estímulo direto aos melanócitos.(51)

Os fatores estimuladores da melanogênese derivados dos queratinócitos incluem: fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento de nervo, endotelina-1 e peptídeos derivados da clivagem da proopiomelanocortina (POMC) – como o hormônio estimulador de melanócito alfa (α MSH) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH).(51)

O α MSH é o mais potente indutor da eumelanogênese, trata-se de um tridecapeptídeo com sequência idêntica ao ACTH nos primeiros 13 aminoácidos(52); seus efeitos são mediados pela ligação ao receptor de melanocortina 1 (MC1-R), que está expresso na superfície dos melanócitos, bem como monócitos, neutrófilos, células da glia, astrócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos.(29) Quando ocorre a ligação do α MSH ao seu receptor, há estímulo à síntese da tirosinase, deflagrando produção de eumelanina (Figura 3).

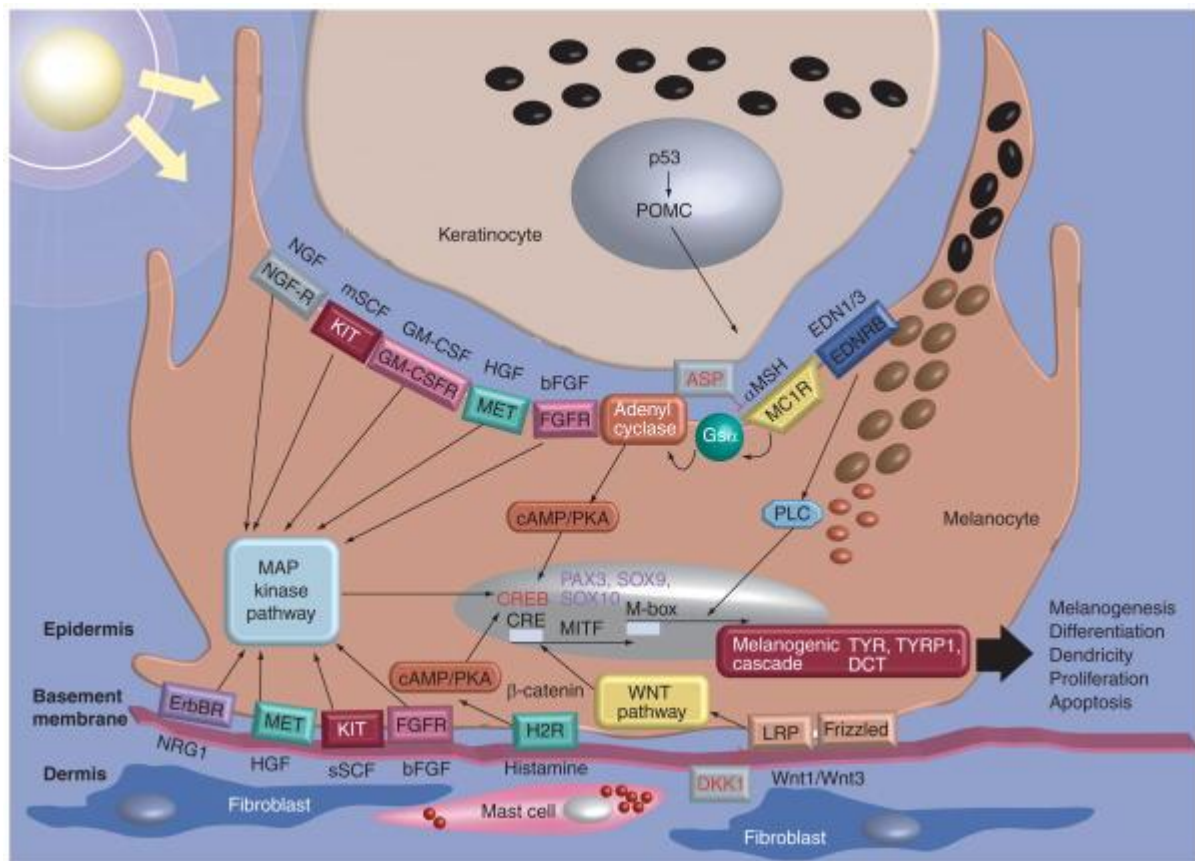


Figura 3. Representação esquemática de diferentes estímulos à melanogênese decorrentes da interação entre um queratinócito e fibroblasto com um melanócito (Fonte: 53).

A RUV, ao atuar de forma direta sobre os melanócitos, aumenta o tamanho e o número deles, intensifica o número de melanossomas em estágio IV que são transferidos aos queratinócitos e estimula a atividade da tirosinase.(29)

In vitro, a proliferação de melanócitos é estimulada por fatores de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento de hepatócito, mastócito/*stem cell factor*, endotelina 1 e MSH.(54)

O receptor de β -estrógeno é expresso na epiderme e em outros tecidos.(55) 17- β -estrógeno aumenta os níveis de RNA mensageiro do MC1-R, o que pode sugerir seu papel na pigmentação do melasma.(56) Tamega e colaboradores identificaram maior expressão proteica deste receptor na pele com melasma, o que reitera a participação hormonal na sua patogênese.(15).

Kim e colaboradores, no ano de 2010, identificaram *downregulation* na expressão do RNA H19 na análise de *microarray* da pele com melasma em comparação com a pele sã de mulheres com melasma. Esta menor expressão estimularia melanogênese e transferência de melanossoma.(57)

Fibroblastos dérmicos também sofrem influência direta tanto da RUV A quanto B, e também participam da atividade melanogênica no melasma.(49,50,58,59) Fibroblastos da pele com melasma e da área perilesional secretam mais fator de crescimento de nervo (NGF)- β do que a pele glútea, sendo capazes de aumentar a melanogênese nos melanócitos epidérmicos humanos em cultura e na pele artificial.(60)

A membrana basal da pele com melasma apresenta mais fragmentação e presença de melanócitos que se projetam da camada basal em direção à derme, sendo chamados de melanócitos em pêndulo.(61) Os danos da zona de membrana basal parecem decorrer do aumento de expressão de metaloproteinase 2, que ocorre frente a fotoexposição crônica.(50) O melasma também apresenta um componente vascular, que se relaciona ao aumento no número de vasos sanguíneos e *upregulation* de fator de crescimento do endotélio vascular.(62)

O fator de transcrição microftalmia (MITF) é um importante regulador da melanogênese, que é capaz de estimular a produção de melanina. Quando α MSH se liga ao seu receptor, MC1-R, há aumento de AMP cíclico o que, em via final, aumenta produção de MITF.(50)

Muitas vias ainda são pobremente estudadas, como a via Wnt/ β -catenina. Wnt é uma proteína fundamental no desenvolvimento dos melanócitos epidérmicos, ao participar da diferenciação das *stem cell* em melanócitos funcionais.(63) Tem atuação tanto pela via canônica quanto não canônica.(64,65) Na primeira, representada na figura 4, há participação de β -cateninas que atuam estimulando a transcrição de genes alvo.(66–68) A via não canônica está relacionada a diversos sinais de transdução, como fluxo de cálcio (via Wnt/cálcio) ou quinase N-terminal c-Jun (JNK).(69) WIF-1 é uma das duas classes de antagonistas extracelulares da via do Wnt, se ligando diretamente ao Wnt no espaço extracelular.

A literatura ainda é muito divergente sobre as vias Wnt e WIF-1. Kim, Lee e Lee, no ano de 2013, evidenciaram *downregulation* de WIF-1 tanto nos queratinócitos quanto nos fibroblastos dérmicos da pele com melasma, ao mesmo tempo que *upregulation* da via de sinalização Wnt (tanto canônica quanto não canônica).(70) Por outro lado, no ano de 2014, Park e colaboradores publicaram resultados em que encontraram expressão de WIF-1 em queratinócitos, fibroblastos, mas também em melanócitos; segundo os autores, o WIF1 apresenta *upregulation* na pele com melasma em comparação com perilesional.(71)

Outra via de interação na melanogênese é através do gene AGOUTI, localizado no cromossomo 20q11.2 e codifica a proteína ASIP (*agouti signaling protein*).(72) Esta proteína, ainda pobremente estudada, atua como inibidor competitivo do receptor de melanocortina, impedindo a ligação do α MSH ao seu receptor e, conseqüentemente, impedindo a ativação

deste receptor.(72) Em melanócitos humanos normais, ASIP anula completamente os efeitos estimulatórios do MSH na proliferação melanocítica e melanogênese, estimulando a produção de feomelanina e fenótipos menos pigmentados, conseqüentemente.(29,73) Entretanto, ainda não há estudos que avaliem a influência da expressão proteica de ASIP em discromias, como o melasma.

A fisiopatologia do melasma não envolve apenas uma disfunção na unidade epidermo-melânica, mas um padrão alterado de interação dermoepidérmica, que envolve, inclusive, alteração no padrão de liberação de citocinas melanogênicas.(50,59,74)

Ainda não são conhecidas as razões que levam a alterações fenotípicas bem demarcadas em áreas tão próximas e susceptíveis aos mesmos fatores ambientais e endógenos.

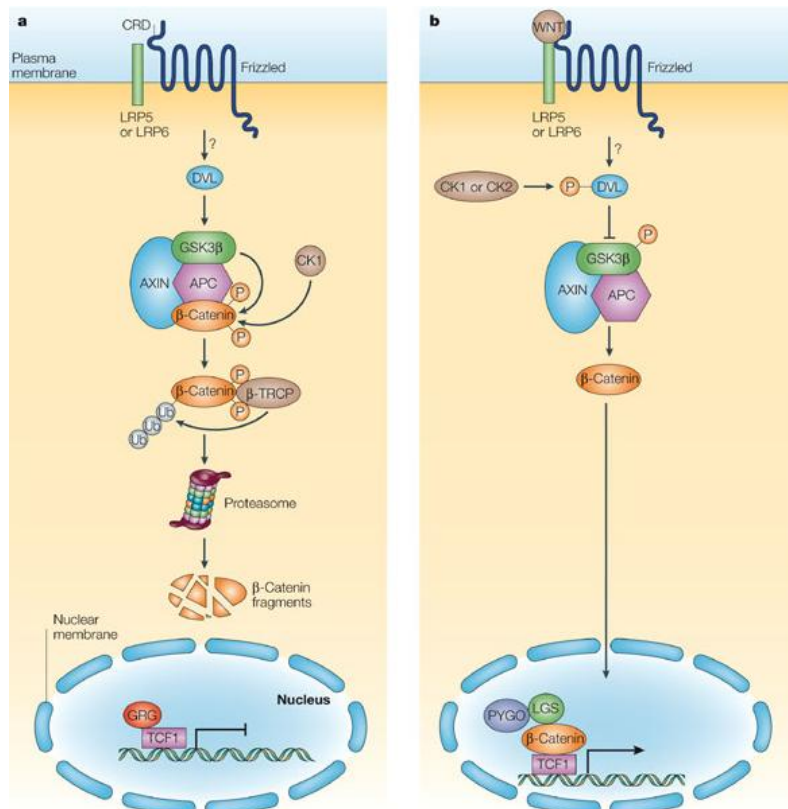


Figura 4 – Representação esquemática da via canônica de Wnt. Quando ativada (b), as β-cateninas citoplasmáticas migram para o núcleo celular e atuam estimulando a transcrição de genes alvo. (Fonte: 67)

TRATAMENTO:

Até o momento, não existe tratamento curativo para o melasma, que tende a

desaparecer gradualmente após a menopausa. As opções disponíveis visam à redução da produção de melanina em detrimento do rearranjo dérmico e dos fatores que desencadeiam o melasma.

A primeira linha de tratamento consiste na combinação entre fotoproteção de amplo espectro, camuflagem e compostos que inibam a síntese de melanina.(75) A segunda linha de tratamento envolve os *peelings* químicos. Lasers e terapias com luz são indicados em pacientes refratários a tratamentos tópicos, mas há o risco de agravamento das lesões.(75)

Adiante, uma síntese da terapêutica do melasma:

Agentes tópicos:

Fotoprotetores: sua utilização é fundamental durante o tratamento com despigmentantes e pós-tratamento, para prevenir recidiva.(76,77) Os filtros solares indicados são aqueles com fator de proteção solar maior de 30, com amplo espectro de proteção UVA e UVB e com bloqueio físico (como óxido de zinco).(76,77) Se possível, deve-se dar preferência aos fotoprotetores com cor porque garantem cobertura mais homogênea e apresentam íons de ferro com ação antioxidante.(77)

Outras medidas que envolvem fotoproteção são: uso de guarda-sol, blusas de mangas longas, chapéus, filme opaco veicular, óculos de sol e roupas com proteção à RUV.(77)

Despigmentantes:

Hidroquinona: estruturalmente semelhante aos precursores da melanina.(76) É o despigmentante mais estudado no tratamento do melasma e atua inibindo a tirosinase,(78) evitando a conversão de DOPA em melanina e inibindo a formação, melanização e degradação dos melanossomas.(76)

Ennes e colaboradores desenvolveram um estudo duplo-cego com 48 pacientes escolhidos randomicamente; 24 destes utilizaram hidroquinona a 4% e os demais utilizaram placebo por um período de 12 semanas. Todos foram instruídos a fazer uso adicional de fotoprotetor. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa. No grupo que fez uso de hidroquinona, 40% dos pacientes apresentaram completo desaparecimento das lesões ao fim das 12 semanas. No grupo placebo, apenas 10% relataram desaparecimento das lesões e 20% dos pacientes apresentaram falha de tratamento.(79) Concentrações de 2% a 4% são as habitualmente utilizadas. Eventos adversos comuns são eritema e irritação facial; eventos mais raros são o cronose e despigmentação em confete, proporcionais ao tempo de uso.(76)

Ácido azelaico: molécula complexa; ácido carboxílico sintetizado pela *Malassezia furfur*. Além de

sua ação na melanogênese, tem ação antibactericida contra *Propionibacterium acnes*, ação antiinflamatória ao reduzir a produção de fatores pró-inflamatórios e também inibe a queratinização folicular. Especificamente na melanogênese, atua por mecanismo anti-proliferativo e com citotoxicidade seletiva contra melanócitos hiperativos, inibindo tirosinase e enzimas da oxireductase mitocondrial.(80) Seu uso na gestação é seguro (droga categoria B) e também parece ser seguro durante amamentação.(81) A concentração habitual de uso está entre 15% a 20%, duas vezes ao dia.

Ácido ascórbico (vitamina C): acredita-se que a sua propriedade despigmentante decorra da capacidade de quelar o cobre, que é um íon utilizado em passos enzimáticos celulares necessários para pigmentação.(78) Espinal-Perez, Moncada e Castanedo-Cazares estudaram 16 mulheres com melasma. Em uma hemiface, utilizaram creme de ácido ascórbico a 5% e em outra hemiface, hidroquinona 4% a noite por 16 semanas. Fizeram uso de fotoprotetor tópico durante o dia. Ao fim do estudo, 93% das pacientes apresentaram resultados bons ou excelentes na hemiface tratada com hidroquinona e 62,5% apresentaram esse mesmo tipo de resultado na hemiface tratada com ácido ascórbico. Entretanto, as medidas colorimétricas não apresentaram diferença estatística significativa. Onze pacientes apresentaram efeito adverso à hidroquinona e apenas um ao ácido ascórbico. Para os autores, o ácido ascórbico pode auxiliar no tratamento do melasma, em uso isolado ou em terapias combinadas.(82) Pode ser utilizado em concentrações até 20%.

Rucinol (4-n-butylresorcinol): Enzima capaz de inibir a atividade da tirosinase e da TRP-1 (proteína relacionada à tirosinase 1). Estudo duplo-cego, randomizado e controlado realizado com mulheres diagnosticadas com melasma facial evidenciou que o serum de resorcinol a 0,3% associado a fotoprotetor é mais eficaz em melhorar o melasma após 12 semanas de tratamento ao ser comparado apenas com veículo e fotoprotetor tópico.(83)

Tretinoína: Inibidor da transcrição da tirosinase, acelera o turnover epidérmico e é capaz de remover grânulos de pigmento dos queratinócitos.

Um estudo controlado comparando tretinoína 0,1% *versus* creme apenas com veículo (aplicação diária por 40 semanas) evidenciou que 68% dos pacientes apresentaram melhora ou muita melhora com uso da tretinoína, comparado com apenas 5% no grupo controle. Melhora significativa ocorreu após 24 semanas do uso de tretinoína, o que é uma melhora lenta. Quanto à histologia, a pigmentação epidérmica reduziu 36% com uso da tretinoína, comparada com aumento em 50% da pigmentação com uso do veículo.(84)

Ácido Kójico: Pode ser usado como substituto à hidroquinona nos pacientes intolerantes. Inibe tirosinase ao atuar como quelante de cobre no sítio ativo da enzima. Disponível nas

concentrações 1-4%.(59)

Corticosteroides: São anti-inflamatórios e têm efeito antimetabólico nos melanócitos, o que faz diminuir o turnover epidérmico e pode levar a uma leve diminuição da pigmentação.(85) Em geral, eles são utilizados em meio à tríplice combinação (vide abaixo), porém, foi descrito o uso do clobetasol como clareador individual.

Sarkar e seus colaboradores, no ano de 2002, publicaram os resultados de um estudo comparativo, randomizado, cego, com 40 pacientes indianos que utilizaram em um lado da face creme com propionato de clobetasol 0,05% por 8 semanas, seguido de ácido azelaico 20% por 16 semanas; já na outra hemiface utilizaram apenas ácido azelaico 20% por 24 semanas, duas vezes ao dia. Os tratamentos foram associados ao uso de fotoprotetor tópico. Até a 16ª semana, o clareamento foi mais evidente na terapia sequencial. Entretanto, com 24 semanas, apesar da diferença ainda estatisticamente significativa, os dois lados obtiveram boa resposta com clareamento: 86% versus 50%.(86,87)

Ácido Tranexâmico tópico: Derivado sintético do aminoácido lisina; habitualmente utilizado como hemostático e no tratamento de sangramento.(88) Seu efeito no tratamento do melasma parece decorrer da sua atividade antiplasmina, já que níveis elevados de plasmina nos queratinócitos induzem a síntese de ácido aracdônio e o aumento de α MSH.(89)

Banihashemi e colaboradores desenvolveram um estudo com pacientes com melasma, no qual aplicavam ácido tranexâmico lipossomal tópico 5% em uma hemiface e hidroquinona 4% na outra, ambos 2x ao dia associados ao uso de fotoprotetor pela manhã. Vinte e três pacientes completaram o estudo. Após 12 semanas de tratamento, não houve diferença estatística significativa na redução do MASI. Para os autores, o ácido tranexâmico tópico é um agente efetivo, seguro e promissor no tratamento do melasma.(90)

Aloe vera lipossomal encapsulado: *Aloe vera* é um produto de origem natural, com atividade antiinflamatória. A tecnologia lipossomal refere-se a uma estrutura organizada que permite a armazenagem de drogas hidrofílicas e lipofílicas separadamente, tanto na fase aquosa quanto lipídica, prevenindo a degradação das mesmas. Como tem a afinidade pela queratina, permite que as substâncias penetrem através da pele, garantindo melhor absorção.(91)

Em um estudo duplo cego em gestantes com melasma no segundo trimestre gestacional, 90 pacientes do grupo experimental receberam o extrato de aloe vera lipossomal encapsulado e as outras 90 do grupo controle receberam apenas o extrato de aloe vera. Após 5 semanas de tratamento, o grupo das pacientes que fez uso do aloe vera lipossomal encapsulado apresentou melhora em 32% no score MASI, já o grupo controle teve melhora de 10%.(92)

Alfa-Arbutin: Inibidor da tirosinase, derivado da hidroquinona (mas menos irritativo que ela) e

mais potente que o ácido kójico. Em geral, utilizado nas concentrações de 1 a 6%. A literatura carece de estudos com este composto; Ertam e colaboradores avaliaram a efetividade de uma fórmula em geral contendo arbutim e ácido elágico sintético (um antioxidante), em comparação com uma fórmula de extrato de plantas. Segundo os autores, ambas formulações foram efetivas no tratamento do melasma.(93)

Combinações tópicas: a tripla combinação composta por hidroquinona 4%, retinoide (tretinoína 0,05%) e corticosteroide fluorado (fluocinolona 0,01%) é considerado o tratamento mais efetivo e seguro para o melasma.(78) Tretinoína previne a oxidação da hidroquinona e aumenta a penetração epidérmica; o corticosteroide diminui a irritação dos demais componentes, além de suprimir a função biosintética e secretória dos melanócitos, promovendo uma resposta mais rápida ao tratamento.(76)

Taylor e seus colaboradores fizeram um estudo randomizado, multicêntrico para comparar a eficácia e segurança da tríplice combinação tretinoína 0,05%, hidroquinona 4% e fluocinolona 0,01% com duplas combinações (tretinoína e hidroquinona, tretinoína e fluocinolona; hidroquinona e fluocinolona) em mesmas concentrações e veículo. Participaram do estudo 641 adultos com melasma moderado a grave. O grupo de pacientes que fez uso da tríplice combinação resultou em índice maior de clareamento completo em comparação aos outros grupos. Na semana oito do tratamento, 75% dos pacientes que fizeram uso da tríplice combinação apresentaram redução da pigmentação, em comparação com apenas 30% dos pacientes dos demais grupos.(94) O uso de duplas combinações está indicado quando não é possível fazer uso da tripla combinação ou se paciente é intolerante.(76)

Tratamento oral:

Ácido Tranexâmico: Derivado sintético do aminoácido lisina; habitualmente utilizado como hemostático e no tratamento de sangramento.(88) Seu efeito no tratamento do melasma parece decorrer da sua atividade antiplasmina, já que níveis elevados de plasmina nos queratinócitos induzem a síntese de ácido aracdônio e o aumento de α MSH.(89) Lee, Thng e Goh fizeram uma análise retrospectiva de 561 pacientes que tomaram a medicação (250mg, duas vezes ao dia, com duração média do tratamento de quatro meses), sendo 91,4% mulheres. 89,7% tiveram melhora do melasma com a medicação; sendo que nestes pacientes a melhora foi obtida dois meses após início do tratamento. A taxa de recorrência foi de 27,2%. Pacientes sem história familiar de melasma tiveram melhor taxa de resposta do que aqueles com história familiar positiva. Eventos adversos ocorreram em 40 pacientes, sendo que um apresentou trombose venosa profunda e foi diagnosticada, após o episódio, com deficiência familiar de proteína S.

Segundo os autores, a medicação parece ser efetiva como adjuvante no tratamento de melasma refratário, mas os pacientes devem antes ser submetidos a *screening* cuidadoso para fatores de risco familiar e pessoal para tromboembolismo.(95)

Extrato de *Polypodium leucotomus*: derivada da samambaia de nome *Polypodium leucotomus*; seu uso já foi descrito como suplemento no tratamento de psoríase, dermatite atópica e erupção polimorfa a luz.(88) Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, trata-se de um potente antioxidante, e parece atuar mantendo a integridade estrutural da matriz extracelular que geralmente é afetada pela radiação ultravioleta.(96)

A dose habitualmente prescrita para o melasma é de 250-500mg duas vezes ao dia por dois a quatro meses. Ahmed e colaboradores estudaram 40 mulheres hispânicas com melasma moderado a grave, sendo que 33 destas completaram o estudo. Um grupo fez uso de 720mg diários de extrato de *Polypodium leucotomus*, enquanto o outro grupo fez uso de placebo, ambos durante 12 semanas e associados ao uso de fotoprotetor. Ambos os grupos apresentaram melhora significativa no índice de melanina e MASI ao fim do estudo, mas sem diferença estatística significativa entre eles.(97) Talvez, polypodium seja importante na prevenção da recidiva após os tratamentos.

Picnogenol: é o extrato da casca do pinheiro marítimo francês (*Pinus pinaster*). Tem ação antioxidante, sendo que estudos *in vitro* já demonstraram ser mais potente que a vitamina E e C. Além disso, é capaz de reciclar a vitamina C, regenerar a vitamina E e estimular o sistema enzimático de antioxidantes endógenos. Também confere proteção contra a RUV.(98)

Um estudo com 30 mulheres com melasma que ingeriam 25mg de Picnogenol três vezes ao dia por 30 dias, resultou em uma taxa de efetividade de 80% da substância, sem relatos de efeitos colaterais.(98)

A dose habitualmente prescrita é de 75 a 100mg ao dia, divididos em duas a três tomadas por dois a quatro meses. A literatura carece de estudos randomizados e controlados que avaliem a real eficácia deste medicamento em associação e comparação com outras estratégias terapêuticas.

Peelings químicos:

Causam exfoliação controlada, seguida por regeneração da epiderme e derme.(76) A utilização de série de peelings químicos superficiais de ácido glicólico, ácido salicílico ou ácido tricloroacético no tratamento do melasma tem evidências de eficácia moderada.(76,99).

O *peeling* de ácido glicólico parece ser o mais eficaz e seguro conforme os estudos da literatura.(99) O *peeling* de ácido salicílico também foi avaliado; Ejaz e colaboradores

compararam o *peeling* de Jessner (14% ácido salicílico, 14% ácido láctico e 14% resorcinol em álcool) com *peeling* de ácido salicílico a 30%. Os autores não encontraram diferença entre os grupos ao comparar o MASI após 12 ou 24 semanas (redução em relação ao basal em ambos os grupos).(100)

Outro estudo comparou *peeling* de Jessner versus *peeling* de ácido tricloroacético 20% versus hidroquinona 2% combinada com ácido kójico por 16 semanas. Neste estudo, o grupo submetido aos *peelings* de ácido tricloroacético apresentou maior redução no MASI em comparação aos outros dois grupos. Entretanto, os pacientes submetidos aos *peelings* apresentaram maiores índices de hiperpigmentação pós-inflamatória, especialmente os que realizaram *peeling* de ácido tricloroacético.(101)

Microagulhamento:

Técnica que consiste na perfuração da pele com centenas de agulhas de aço inoxidável, alinhadas e estéreis presas a um rolo de polietileno. A técnica envolve a realização de movimentos de ida e volta, até obtenção de petéquias na pele.(102) Nesta técnica, também podem ser adicionados tópicos clareadores durante o procedimento.

Lima descreveu os resultados do seu estudo em 22 pacientes com melasma recidivante (sem resposta a tratamento com fotoprotetor e cremes). Os pacientes foram submetidos a microagulhamento sem aplicação de qualquer ativo tópico durante o procedimento. Utilizou-se anestésico tópico antes do procedimento. Foram utilizadas agulhas de 1,5mm, tendo sido realizados movimentos de ida e volta, aproximadamente 10 vezes e em 4 direções e sobreposição de quatro fileiras, até atingir eritema e sangramento discreto. O procedimento foi repetido após 30 dias. Os pacientes utilizaram fotoprotetor e creme combinado de tretinoína 0,05%, hidroquinona 4% e fluocinolona 1% a partir de 24 horas pós procedimento.

Todos os pacientes ficaram satisfeitos com o resultado após dois meses; o autor manteve seguimento de 11 deles por 24 meses, todos mantiveram o clareamento observado.(102) O mecanismo exato que deflagra o clareamento após microagulhamento não é conhecido.

Budamakuntla e seus colaboradores compararam a eficácia terapêutica de microinjeções de ácido tranexâmico versus microagulhamento com aplicação de ácido tranexâmico em pacientes com melasma. O estudo envolveu 60 pacientes (30 em cada braço do mesmo). Os procedimentos foram realizados na semana 0, 4 e 8, sendo que os pacientes foram seguidos por três meses consecutivos. No grupo submetido a microinjeções, houve 35,7% de melhora no MASI, enquanto no grupo do microagulhamento a melhora foi de 44,4%.

Os autores atribuíram a melhor resposta terapêutica no grupo submetido ao microagulhamento associado a ácido tranexâmico à dispensação mais profunda e uniforme do medicamento através dos microcanais criados pelo microagulhamento.(103)

Dermabrasão:

Técnica que envolve abrasão mecânica da pele danificada, objetivando a reepitelização.(104) Dermabrasão é capaz de remover toda a epiderme e adentrar na derme papilar e, até mesmo, derme reticular.(104)

Kunachak e colaboradores avaliaram 533 pacientes com melasma tratados com dermabrasão utilizando lixa de diamante rotatória; 410 pacientes foram seguidos a longo prazo (média de 5 anos), sendo que 398 destes (97%) apresentaram clareamento persistente do melasma. Efeitos adversos temporários foram eritema pós-operatório, hiperpigmentação, prurido, mília. Dois pacientes apresentaram cicatrizes hipertróficas e um paciente teve hipopigmentação permanente na frente.(105)

Lasers e Terapias com Luz:

Apresentam maiores índices de efeitos adversos devido ao dano direto à pele, podendo gerar uma hiperpigmentação paradoxal. São especialmente de risco os pacientes de maior fototipo, ou que não seguem fotoproteção rigorosa.(78)

Luz Intensa Pulsada (LIP): Seu mecanismo envolve utilização de lâmpada de cloreto de xenônio que emite luz não-coerente, não-colimada e que tem amplo espectro (500-1200 nm). Seus parâmetros – comprimento de onda, fluência, número de pulsos, duração dos pulsos – podem ser ajustados, o que configura uma vantagem.(106)

Goldman e seus colaboradores estudaram a eficácia e segurança de creme tríplice combinação (hidroquinona 4%, tretinoína 0,05%, fluocinolona 0,01%) associado a LIP em pacientes com melasma moderado a grave. O estudo teve duração de 10 semanas, com participação de 56 pacientes. Em uma hemiface, utilizaram a tríplice combinação; na outra hemiface, creme inativo. Nas semanas 2 e 6 foi realizado LIP. O MASI foi significativamente menor na hemiface que fez o tratamento combinado (tríplice combinação + LIP) na semana 6 e 10.(107)

Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet (QS-Nd:YAG) Laser: é o laser mais utilizado no tratamento do melasma. Em geral, é utilizado fluência de 5 5 J/cm², spot de 6mm e frequência de 10 Hz. O número de sessões varia de 5 a 10, com intervalo de 1 mês.(106) O comprimento de onda de 1064 nm é bem absorvido pela melanina e causa mínimos danos na epiderme, além

de não ser absorvido pela hemoglobina. A penetração profunda auxilia a atingir o alvo, que é a melanina.(106)

Vinte e sete pacientes foram submetidos a tratamento do melasma utilizando modo fracionado Pixel QS Nd:YAG (1064 nm), com oito sessões a intervalos de duas a três semanas e foram mantidas em seguimento clínico por doze semanas após as sessões. As lesões apresentaram clareamento moderado e 70% dos indivíduos caracterizaram a melhora como boa ou notável. 40% dos pacientes tiveram recidiva parcial no seguimento de 12 semanas. Nenhum evento adverso grave ocorreu e o tratamento foi bem tolerado.(108)

Já 34 pacientes com melasma foram tratadas com laser 1064-nm QS-Nd:YAG, spot 6mm e fluência de 2.5 J/cm² com múltiplas passadas em seis a dez sessões (intervalo de duas semanas entre elas). Ao fim do tratamento, vinte pacientes relataram melhora pelo menos em 50% da gravidade de suas lesões; um ano após a suspensão do tratamento, 58.8% apresentou recidiva.(109)

Q-Switched Ruby Laser: Tem comprimento de onda de 694 nm e é mais seletivo para melanina do que o QS-Nd: YAG. Entretanto, os resultados das pesquisas que o utilizaram para tratamento do melasma são bastante controversos, por isso são necessários novos estudos para estabelecer sua eficácia e segurança real no tratamento desta discromia.(106)

Erbium: YAG Laser: Tem comprimento de onda de 2940 nm e é altamente absorvido pela água. Faz ablação da pele com mínimo dano térmico. Manaloto e Aster submeteram 10 mulheres com melasma refratário a peeling químico e cremes de uso domiciliar a um *resurfacing* com Erbium: YAG laser 5.1-7.6 J/cm² de energia. As pacientes apresentaram melhora no melasma imediatamente após o laser, entretanto todas apresentaram hiperpigmentação pós-inflamatória entre 3 a 6 semanas após o procedimento.(110)

Pulsed Dye Laser (PDL): Utilizado principalmente para tratamento de lesões vasculares. Sua utilização no melasma é baseada nas alterações vasculares que permeiam a fisiopatologia da dermatose, tendo como alvo o componente vascular.(106)

Passeron e colaboradores realizaram um estudo em 17 mulheres caucasianas com diagnóstico de melasma. Eles compararam o tratamento da tríplice combinação tópica associada ao PDL (iniciado após um mês de uso dos tópicos) com apenas uso da tríplice combinação. Os pacientes foram submetidos a 3 sessões com intervalo de três semanas, com os seguintes parâmetros de aplicação: fluência 7-10 J/cm², duração de pulso de 1,5 ms. O tratamento combinado apresentou resultado mais satisfatório nos pacientes de fototipo II e III e três pacientes apresentaram hiperpigmentação pós-inflamatória (todas fototipo IV de Fitzpatrick).(111)

Laser fracionado não ablativo: o laser fracionado não ablativo com comprimento de onda de 1550 nm atinge principalmente a água. Por ser fracionado, formam-se diversas zonas pequenas de coagulação separadas por tecido são, que permitem o transporte e a extrusão de debris necróticos, inclusive melanina. Em geral, não há lesão epidérmica visível e o extrato córneo apresenta-se intacto em 24 horas.(106,112)

Um estudo envolvendo 20 mulheres com melasma moderado a grave e de fototipos II a V de Fitzpatrick foram randomizadas em dois grupos e tratadas com combinação tripla tópica (hidroquinona 5%, tretinoína 0,05%, triancinolona 0,1%) uma vez ao dia por 8 semanas ou com laser fracionado não ablativo 1550nm duas vezes na semana por 2 semanas. Não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto ao MASI, índice de melanina e recidiva em 6 meses.(78,112)

De forma geral, estratégias terapêuticas que gerem inflamação ou dano epidérmico oferecem grande risco de hiperpigmentação pós-inflamatória e recidiva do melasma.

Enquanto as vias que deflagram a melanogênese do melasma não forem amplamente conhecidas, as estratégias terapêuticas não serão completamente efetivas e as recidivas serão frequentes.

Referências:

1. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol.* 2014;89(5):771–82.
2. Cestari T, Peruzzo J, Giongo N. Definition, incidence, and etiology of melasma in brown skin. In: Handog EB, Enriquez-Macarayo MJ. *Melasma and vitiligo in brown skin.* India: Springer; 2017. p. 13–9.
3. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol.* 2006;81(6):549-58.
4. Lupi O, Nunes S, Gomes Neto A, Pérciles C. Doenças dermatológicas no Brasil: perfil atitudinal e epidemiológico. *An Bras Dermatol.* 2010;85(Supl 1):5-19.
5. Handel AC, Lima PB, Tonolli VM, Miot LDB, Miot HA. Risk factors for facial melasma in women: a case-control study. *Br J Dermatol.* 2014;171(3):588–94.
6. Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a comprehensive update: part I. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(4):689–697.
7. Tamega A de A, Miot LDB, Bonfietti C, Gige TC, Marques MEA, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(2):151–6.
8. Taylor SC. Epidemiology of skin diseases in ethnic populations. *Dermatol Clin.* 2003;21(4):601–7.
9. Perez M, Luke J, Rossi A. Melasma in latin americans. *J Drugs Dermatol.* 2011;10(5):517–23.
10. Ishiy PS, Silva LRE, Penha MÁ, Handel AC, Miot HA. Skin diseases reported by workers from UNESP campus at Rubião Jr, Botucatu-SP (Brazil). *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):529–31.
11. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol.* 1995;131(12):1453–7.
12. Achar A, Rathi SK. Melasma: a clinico-epidemiological study of 312 cases. *Indian J Dermatol.* 2011;56(4):380–2.
13. Sarkar R, Jain RK, Puri P. Melasma in Indian males. *Dermatol Surg.* 2003;29(2):204.
14. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, Machado Filho CAS, Kalil CLPV, Ayres EL, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol.* 2014;53(4):440–4.
15. Tamega A de A, Miot HA, Moço NP, Silva MG, Marques MEA, Miot LDB. Gene and protein expression of oestrogen- β and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosmet Sci.* 2015;37(2):222–8.

16. Çakmak SK, Özcan N, Kılıç A, Koparal S, Artüz F, Çakmak A, et al. Etiopathogenetic factors, thyroid functions and thyroid autoimmunity in melasma patients. *Adv Dermatol Allergol Dermatol Alergol*. 2015;32(5):327–30.
17. Guinot C, Cheffai S, Latreille J, Dhaoui MA, Youssef S, Jaber K, et al. Aggravating factors for melasma: a prospective study in 197 Tunisian patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(9):1060–9.
18. Scheinfeld NS. Melasma. *Skinmed*. 2007;6(1):35–7.
19. Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M, Cestari T, Chan H, Grimes P, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(11):1254–62.
20. Pichardo R, Vallejos Q, Feldman SR, Schulz MR, Verma A, Quandt SA, et al. The prevalence of melasma and its association with quality of life in adult male Latino migrant workers. *Int J Dermatol*. 2009;48(1):22–6.
21. D'Elia MPB, Brandão MC, de Andrade Ramos BR, da Silva MG, Miot LDB, Dos Santos SEB, et al. African ancestry is associated with facial melasma in women: a cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):17.
22. Wilson GR, Curry RW. Subclinical thyroid disease. *Am Fam Physician*. 2005;72(8):1517–24.
23. Prabha N, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Gupta M. Cosmetic contact sensitivity in patients with melasma: results of a pilot study. *Dermatol Res Pract*. 2014; 2014: 316219.
24. Dereure O. Drug-induced skin pigmentation. Epidemiology, diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(4):253–62.
25. Ghunawat S, Sarkar R, Garg VK. Imatinib induced melasma-like pigmentation: Report of five cases and review of literature. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2016;82(4):409.
26. Kar SK. Melasma: a rare adverse effect of clomipramine. *Indian J Pharmacol*. 2016;48(4):453–4.
27. Tunca Z, Tunca MI, Dilsiz A, Bayol U, Hancioğlu M. Clomipramine-induced pseudocyanotic pigmentation. *Am J Psychiatry*. 1989;146(4):552–3.
28. Duarte I, Campos Lage AC. Frequency of dermatoses associated with cosmetics. *Contact Dermatitis*. 2007;56(4):211–3.
29. Miot LDB, Miot HA, Silva MG da, Marques MEA. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol*. 2009;84(6):623–35.
30. Sarkar R, Puri P, Jain RK, Singh A, Desai A. Melasma in men: a clinical, aetiological and histological study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(7):768–72.
31. Keeling J, Cardona L, Benitez A, Epstein R, Rendon M. Mequinol 2%/tretinoin 0.01% topical solution for the treatment of melasma in men: a case series and review of the literature. *Cutis*. 2008;81(2):179–83.
32. Vázquez M, Maldonado H, Benmamán C, Sánchez JL. Melasma in men. A clinical and histologic study. *Int J Dermatol*. 1988;27(1):25–7.
33. Sarkar R, Arora P, Garg VK, Sonthalia S, Gokhale N. Melasma update. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(4):426–35.
34. Sialy R, Hassan I, Kaur I, Dash RJ. Melasma in men: a hormonal profile. *J Dermatol*. 2000;27(1):64–5.
35. Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm MC. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol*. 1981;4(6):698–710.
36. Kang HY, Bahadoran P, Suzuki I, Zugaj D, Khemis A, Passeron T, et al. In vivo reflectance confocal microscopy detects pigmentary changes in melasma at a cellular level resolution. *Exp Dermatol*. 2010;19(8):228–233.
37. Pandya AG, Guevara IL. Disorders of hyperpigmentation. *Dermatol Clin*. 2000;18(1):91–98.
38. Pandya AG, Hynan LS, Bhore R, Riley FC, Guevara IL, Grimes P, et al. Reliability assessment and validation of the Melasma Area and Severity Index (MASI) and a new modified MASI scoring method. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(1):78–83.
39. Rodrigues M, Ayala-Cortés AS, Rodríguez-Arámbula A, Hynan LS, Pandya AG. Interpretability of the Modified Melasma Area and Severity Index (mMASI). *JAMA Dermatol*. 2016;152(9):1051–2.
40. Abou-Taleb DAE, Ibrahim AK, Youssef EMK, Moubasher AEA. Reliability, validity, and sensitivity to change overtime of the modified Melasma Area and Severity Index score. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2017;43(2):210–7.
41. Anderson RT, Rajagopalan R. Development and validation of a quality of life instrument for cutaneous diseases. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(1):41–50.
42. Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT, Saltzberg F, Housman TS, Grummer S, et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol*. 2003;149(3):572–7.
43. Chren MM, Lasek RJ, Sahay AP, Sands LP. Measurement properties of Skindex-16: a brief quality-of-life measure for patients with skin diseases. *J Cutan Med Surg*. 2001;5(2):105–10.
44. Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)—a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol*. 1994;19(3):210–6.

45. Harumi O, Leok Goh C. The Effect of Melasma on the quality of life in a sample of women living in Singapore. *J Clin Aesthetic Dermatol*. 2016;9(1):21–4.
46. Maranzatto CFP, Miot HA, Miot LDB, Meneguini S. Psychometric analysis and dimensional structure of the Brazilian version of melasma quality of life scale (MELASQoL-BP). *An Bras Dermatol*. 2016;91(4):422–8.
47. Freitag FM, Cestari TF, Leopoldo LR, Paludo P, Boza JC. Effect of melasma on quality of life in a sample of women living in southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22(6):655–62.
48. 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(1):59–66.
49. Miot LDB, Miot HA, Silva MG da, Marques MEA. Morphological and functional comparative study of melanocytes in melasma lesions. *An Bras Dermatol*. 2007;82(6):529–34.
50. Bastonini E, Kovacs D, Picardo M. Skin Pigmentation and Pigmentary Disorders: Focus on epidermal/dermal cross-talk. *Ann Dermatol*. 2016;28(3):279–89.
51. Lee A-Y. Recent progress in melasma pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(6):648–60.
52. Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res*. 1998;11(5):265–74.
53. Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol*. 2011;6(1):97–108.
54. Halaban R. The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res*. 2000;13(1):4–14.
55. Jang YH, Lee JY, Kang HY, Lee E-S, Kim YC. Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(11):1312–6.
56. Im S, Lee ES, Kim W, On W, Kim J, Lee M, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes. *J Korean Med Sci*. 2002;17(1):58–64.
57. Kim N-H, Lee C-H, Lee A-Y. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23(1):84–92.
58. Shin J, Kim J-H, Kim EK. Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1577–80.
59. Torres-Álvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cázarez JP, Fuentes-Ahumada C, Oros-Ovalle C, Navarrete-Solis J, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. *Am J Dermatopathol*. 2011;33(3):291–5.
60. Byun JW, Park IS, Choi GS, Shin J. Role of fibroblast-derived factors in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol*. 2016;41(6):601–9.
61. Lee D, Park K-C, Ortonne J, Kang H. Pendulous melanocytes: a characteristic feature of melasma and how it may occur. *Br J Dermatol*. 2012;166(3):684–6.
61. Kim EH, Kim YC, Lee E-S, Kang HY. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci*. 2007;46(2):111–6.
63. Fang D, Leishear K, Nguyen TK, Finko R, Cai K, Fukunaga M, et al. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2006;24(7):1668–77.
64. Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2008;22(4):1009–20.
65. Kim J-H, Sohn K-C, Choi T-Y, Kim MY, Ando H, Choi SJ, et al. Beta-catenin regulates melanocyte dendricity through the modulation of PKCzeta and PKCdelta. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23(3):385–93.
66. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*. 1996;10(12):1443–54.
67. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*. 1999;18(55):7860–72.
68. Schepsky A, Bruser K, Gunnarsson GJ, Goodall J, Hallsson JH, Goding CR, et al. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Mol Cell Biol*. 2006;26(23):8914–27.
69. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol*. 1999;9(13):695–8.
70. Kim J-Y, Lee T-R, Lee A-Y. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):191–200.
71. Park TJ, Kim M, Kim H, Park SY, Park K-C, Ortonne J-P, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(1):72–81.
72. Wolf Horrell EM, Boulanger MC, D’Orazio JA. Melanocortin 1 Receptor: Structure, Function, and Regulation. *Front Gen*. 2016; 7: 95.
73. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. 1994;371(6500):799–802.

74. Miot LD, Miot HA, Poletini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol.* 2010;32(7):676–82.
75. Taraz M, Niknam S, Ehsani AH. Tranexamic acid in treatment of melasma: A comprehensive review of clinical studies. *Dermatol Ther.* [Ahead of print 2017].
76. Shankar K, Godse K, Aurangabadkar S, Lahiri K, Mysore V, Ganjoo A, et al. Evidence-based treatment for melasma: expert opinion and a review. *Dermatol Ther.* 2014;4(2):165–86.
77. Schalka S, Steiner D, Ravelli FN, Steiner T, Terena AC, Marçon CR, et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. *An Bras Dermatol.* 2014;89(6 Suppl 1):1–74.
78. Rivas S, Pandya AG. Treatment of melasma with topical agents, peels and lasers: an evidence-based review. *Am J Clin Dermatol.* 2013;14(5):359–76.
79. Ennes SBP, Paschoalick RC, Mota de Avelar AM. A double-blind, comparative, placebo-controlled study of the efficacy and tolerability of 4% hydroquinone as a depigmenting agent in melasma. *J Dermatol Treat.* 2000;11:173-79.
80. Nazzaro-Porro M. Azelaic acid. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(6):1033–41.
81. Schulte BC, Wu W, Rosen T. Azelaic acid: evidence-based update on mechanism of action and clinical application. *J Drugs Dermatol.* 2015;14(9):964–8.
82. Espinal-Perez LE, Moncada B, Castaneda-Cazares JP. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *Int J Dermatol.* 2004;43(8):604–7.
83. Khemis A, Kaiafa A, Queille-Roussel C, Duteil L, Ortonne JP. Evaluation of efficacy and safety of rucinol serum in patients with melasma: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2007;156(5):997–1004.
84. Griffiths CE, Finkel LJ, Ditre CM, Hamilton TA, Ellis CN, Voorhees JJ. Topical tretinoin (retinoic acid) improves melasma. A vehicle-controlled, clinical trial. *Br J Dermatol.* 1993;129(4):415–21.
85. Lynde CB, Kraft JN, Lynde CW. Topical treatments for melasma and postinflammatory hyperpigmentation. *Skin Ther Lett.* 2006;11(9):1–6.
86. Sarkar R, Bhalla M, Kanwar AJ. A comparative study of 20% azelaic acid cream monotherapy versus a sequential therapy in the treatment of melasma in dark-skinned patients. *Dermatol Basel Switz.* 2002;205(3):249–54.
87. Steiner D, Feola C, Biakeski N, de Moraes FA, Antiori ACP, Addor FASA, et al. Estudo de avaliação da eficácia do ácido tranexâmico tópico e injetável no tratamento do melasma. *Surg Cosmet Dermatol.* 2009;1(4):174-7.
88. Zhou LL, Baibergenova A. Melasma: systematic review of the systemic treatments. *Int J Dermatol.* [Ahead of print 2017].
89. Maeda K, Tomita Y. Mechanism of the inhibitory effect of tranexamic acid on melanogenesis in cultured human melanocytes in the presence of keratinocyte-conditioned medium. *J of Health Science.* 2007;53(4):389-96.
90. Banihashemi M, Zabolinejad N, Jaafari MR, Salehi M, Jabari A. Comparison of therapeutic effects of liposomal tranexamic acid and conventional hydroquinone on melasma. *J Cosmet Dermatol.* 2015;14(3):174–7.
91. Venkataharsha P, Maheshwara E, Raju YP, Reddy VA, Rayadu BS, Karisetty B. Liposomal Aloe vera trans-emulgel drug delivery of naproxen and nimesulide: a study. *Int J Pharm Investig.* 2015;5(1):28–34.
92. Ghafarzadeh M, Eatemadi A. Clinical efficacy of liposome-encapsulated *Aloe vera* on melasma treatment during pregnancy. *J Cosmet Laser Ther.* 2017;19(3):1–7.
93. Ertam I, Mutlu B, Unal I, Alper S, Kivçak B, Ozer O. Efficiency of ellagic acid and arbutin in melasma: a randomized, prospective, open-label study. *J Dermatol.* 2008;35(9):570–4.
94. Ferreira Cestari T, Hassun K, Sittart A et al. A comparison of triple combination cream and hydroquinone 4% cream for the treatment of moderate to severe facial melasma. *J Cosmet Dermatol.* 2007;6(1):36-9
95. Lee HC, Thng TGS, Goh CL. Oral tranexamic acid (TA) in the treatment of melasma: a retrospective analysis. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(2):385–92.
96. Nestor M, Bucay V, Callender V, Cohen JL, Sadick N, Waldorf H. *Polypodium leucotomos* as an adjunct treatment of pigmentary disorders. *J Clin Aesthetic Dermatol.* 2014;7(3):13–7.
97. Ahmed AM, Lopez I, Perese F, Vasquez R, Hynan LS, Chong B, et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of oral *Polypodium leucotomos* extract as an adjunct to sunscreen in the treatment of melasma. *JAMA Dermatol.* 2013;149(8):981–3.
98. Ni Z, Mu Y, Gulati O. Treatment of melasma with pycnogenol. *Phytother Res.* 2002;16(6):567–71.
99. Sarkar R, Bansal S, Garg VK. Chemical peels for melasma in dark-skinned patients. *J Cutan Aesthetic Surg.* 2012;5(4):247–53.
100. Ejaz A, Raza N, Iftikhar N, Muzzafar F. Comparison of 30% salicylic acid with Jessner's solution for superficial chemical peeling in epidermal melasma. *J Coll Physicians Surg.* 2008;18(4):205–8.
101. Azzam OA, Leheta TM, Nagui NA, Shaarawy E, Hay RMA, Hilal RF. Different therapeutic modalities for treatment of melasma. *J Cosmet Dermatol.* 2009;8(4):275–81.

102. Lima E de A. Microneedling in facial recalcitrant melasma: report of a series of 22 cases. *An Bras Dermatol*. 2015;90(6):919–21.
103. Budamakuntla L, Loganathan E, Suresh DH, Shanmugam S, Suryanarayan S, Dongare A, et al. A randomised, open-label, comparative study of tranexamic acid microinjections and tranexamic acid with microneedling in patients with melasma. *J Cutan Aesthetic Surg*. 2013;6(3):139–43.
104. Fabbrocini G, Annunziata MC, D'Arco V, De Vita V, Lodi G, Mauriello MC, et al. Acne Scars: Pathogenesis, Classification and Treatment. *Dermatol Res Pract*. 2010; 2010: 893080
105. Kunachak S, Leelaudomlipi P, Wongwaisayawan S. Dermabrasion: a curative treatment for melasma. *Aesthetic Plast Surg*. 2001;25(2):114–7.
106. Arora P, Sarkar R, Garg VK, Arya L. Lasers for treatment of melasma and post-inflammatory hyperpigmentation. *J Cutan Aesthetic Surg*. 2012;5(2):93–103.
107. Goldman MP, Gold MH, Palm MD, Colón LE, Preston N, Johnson LA, et al. Sequential treatment with triple combination cream and intense pulsed light is more efficacious than sequential treatment with an inactive (control) cream and intense pulsed light in patients with moderate to severe melasma. *Dermatol Surg*. 2011;37(2):224–33.
108. Yue B, Yang Q, Xu J, Lu Z. Efficacy and safety of fractional Q-switched 1064-nm neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser in the treatment of melasma in Chinese patients. *Lasers Med Sci*. 2016 Nov;31(8):1657–63.
109. Gokalp H, Akkaya AD, Oram Y. Long-term results in low-fluence 1064-nm Q-Switched Nd:YAG laser for melasma: is it effective? *J Cosmet Dermatol*. 2016;15(4):420–6.
110. Manaloto RM, Alster T. Erbium:YAG laser resurfacing for refractory melasma. *Dermatol Surg*. 1999;25(2):121–3.
111. Passeron T, Fontas E, Kang HY, Bahadoran P, Lacour J-P, Ortonne J-P. Melasma treatment with pulsed-dye laser and triple combination cream: a prospective, randomized, single-blind, split-face study. *Arch Dermatol*. 2011;147(9):1106–8.
112. Kroon MW, Wind BS, Beek JF, Wietze van der Veen JP, Nieuweboer-Krobotová L, Bos JD, et al. Nonablative 1550-nm fractional laser therapy versus triple topical therapy for the treatment of melasma: a randomized controlled pilot study. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(3):516–23.

Objetivos

1. Avaliar as características histológicas quanto ao grau de elastose solar, quantidade de melanina epidérmica e dérmica, alterações da camada córnea e zona de membrana basal, fibras elásticas e colágenas, estruturas vasculares, melanócitos em pêndulo, número de mastócitos e celularidade dérmica da pele com melasma em comparação com a pele sã adjacente e retroauricular.
2. Avaliar, comparativamente, a expressão de Wnt1, WIF-1 e ASIP nos três sítios de interesse.
3. Avaliar, comparativamente, a ultraestrutura da pele com melasma, pele sã adjacente e retroauricular, quanto danos à zona da membrana basal, número de organelas citoplasmáticas e grau de maturação dos melanossomas.
4. Analisar as correlações entre alterações morfológicas e expressão epidérmica de Wnt1, WIF-1, ASIP na pele acometida, perilesional e retroauricular.

Artigo principal

Categoria: Investigação

Título: Melasma decorre da integração entre as alterações na epiderme, derme superficial, zona da membrana basal e via Wnt.

Title: *Melasma arises from the integration among changes in epidermis, upper dermis, basement membrane zone and Wnt pathway.*

Autores:

Ana Cláudia Cavalcante Espósito, MD (1)

anaclaudiaesposito@gmail.com

Gabrieli Brianezi, PhD (2)

gabibrianezi@yahoo.com.br

Nathália Pereira de Souza, Msc (2)

nathalips@gmail.com

Luciane Donida Bartoli Miot, PhD (1)

lucianemiot@fmb.unesp.br

Hélio Amante Miot, PhD, Livre-docente (1)

heliomiot@fmb.unesp.br

(1) Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-000.

(2) Departamento de Patologia (TOXICAM) da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

Local onde o trabalho foi realizado:

Departamentos de Dermatologia e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-000.

Endereço de correspondência:

Prof. Hélio Amante Miot.

Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp,
SN, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-000.

Fone/FAX: +55 14 38824922

Email: heliomiot@fmb.unesp.br

Conflito de interesses: Nenhum; **Financiamento:** FUNADERSP – Fundo de apoio à
Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio.

Resumo

Fundamentos: Melasma é hipermelanose crônica e adquirida que afeta áreas fotoexpostas. Sua patogênese não é completamente conhecida. Estudos clássicos avaliam apenas a pele acometida e perilesional, mas pouco se sabe do comportamento da pele fotoprottegida, submetida aos mesmos fatores sistêmicos e genéticos.

Objetivos: Avaliar características histológicas, vias epidérmicas que influem na melanogênese (Wnt e ASIP) e características ultraestruturais do melasma em comparação com a pele sã adjacente e retroauricular (fotoprottegida).

Métodos: Estudo transversal com controle intra-sujeito. Foram incluídas onze mulheres com melasma facial que estavam sem tratamento há pelo menos trinta dias, exceto pelo uso de filtro solar. As participantes foram submetidas à biópsia cutânea em três áreas: melasma, perilesional e retroauricular. Fragmentos provenientes de dez participantes foram corados (hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff, Fontana-Masson, picrosirius *red*, azul de toluidina e Verhoeff), imunomarcados para CD34 e submetidos à imunofluorescência direta (IFD) de dupla marcação para as proteínas epidérmicas Wnt1, WIF-1 e ASIP. Três fragmentos provenientes de uma participante foram processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Dados foram comparados entre as topografias por modelo linear generalizado de efeitos mistos.

Resultados: A idade média (desvio-padrão) dos sujeitos foi 42,9 (8,9) anos, fototipos III a IV e apresentavam lesões há 16,7 (7,9) anos. Houve adelgaçamento da camada córnea nas áreas fotoexpostas (melasma e pele adjacente), mas a compactação da córnea foi maior no melasma. Na pele com melasma também houve maior pigmentação melânica epidérmica, maior heterogeneidade do colágeno, elastose solar, maior número de mastócitos, falhas da integridade da zona da membrana basal, melanócitos em pêndulo, bem como maior celularidade e vasos na derme superficial. IFD evidenciou maior intensidade de marcação de Wnt1 na pele com melasma em relação à pele adjacente e maior intensidade na pele retroauricular em relação à pele sã adjacente. Não houve diferença estatística significativa na intensidade de marcação de WIF-1 e ASIP entre as topografias. À MET, houve maior dano estrutural na lâmina lúcida no melasma.

Limitações do estudo: Número restrito de participantes; melasma apenas facial em mulheres provenientes de único centro.

Conclusões: Além da hipertrofia melanocítica, a pele com melasma apresenta alterações na barreira epidérmica, na derme superior, zona de membrana basal e quanto a ativação da via Wnt, que diferem da pele fotoexposta adjacente e da retroauricular, configurando um fenótipo individualizado, e não somente uma extensão do fotoenvelhecimento ou do envelhecimento intrínseco.

Palavras-chave: Melasma; Microscopia Eletrônica; Histologia; Luz Solar; Raios Ultravioletas; Colágeno; Melanose; Melanócitos; Melanossomas; Técnica Direta de Fluorescência para Anticorpo; Imunofluorescência.

Abstract

Background: *Melasma is a chronic and acquired hypermelanosis that occurs in sun-exposed areas, whose pathogenesis is not completely known. Classical studies evaluated only affected and perilesional skin, but little is known about the non-sun-exposed skin, subjected to the same systemic and genetic factors.*

Objectives: *To evaluate the histomorphometric features, epidermal pathways that influence melanogenesis (Wnt and ASIP) and ultrastructural characteristics of melasma skin in comparison with adjacent and retroauricular skin.*

Methods: *A cross-sectional study with intrasubject control. Eleven women with facial melasma and without treatment for, at least, thirty days (except sunscreen) were included in this project. After signing the Free and Informed Consent Term, participants were submitted to three skin biopsies in different areas: melasma, perilesional and retroauricular non-sun-exposed skin. Fragments from ten participants were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid from Schiff, Fontana-Masson, picosirius red, toluidine blue and Verhöff; immunomarked for CD34 and subjected to double-labeled direct immunofluorescence (DIF) for Wnt1, WIF-1 and ASIP proteins. The three fragments of one of the participants were processed for Transmission Electron Microscopy (TEM). The data were compared among sites by generalized linear model of mixed effects.*

Results: *Participants were Fitzpatrick's phototype III or IV; the mean age (standard deviation) was 42.9 (8.9) years and they had lesions for 16.7 (7.9) years. There was thinning of the corneal layer on sun-exposed skin (melasma and adjacent skin). The skin with melasma also presented more corneal compaction, greater epidermal melanic pigmentation, greater collagen heterogeneity, solar elastosis, more mast cells, defects of the basement membrane area, pendulum melanocytes, as well as greater cellularity and vessels in the superficial dermis. DIF showed a greater intensity of Wnt1 labeling in the skin with melasma in relation to the adjacent skin and greater intensity in the non-sun-exposed skin in relation to the adjacent healthy skin. There was no significant statistical difference in the intensity of WIF-1 and ASIP marking between topographies. At TEM, there was greater structural damage to the lucida lamina in melasma.*

Limitations of the study: *Small number of participants. Only facial melasma in women from a single center.*

Conclusions: *In addition to melanocytic hypertrophy, melasma skin presents morphological changes in epidermal barrier, upper dermis, basement membrane zone and in Wnt pathway activation, which differ from adjacent sun-exposed skin and retroauricular skin, forming an individualized phenotype, and not only an extension of photoaging or intrinsic aging.*

Key-words: *Melasma; Microscopy, Electron; Histology; Sunlight; Ultraviolet Rays; Collagen; Melanosis; Melanocytes; Melanosomes; Fluorescent Antibody Technique, Direct; Fluorescent Antibody Technique.*

Introdução:

Melasma é hipermelanose crônica e adquirida que acomete áreas fotoexpostas, preferencialmente a face.(1,2) Ocorre, principalmente, em mulheres (10:1), especialmente nos fototipos III a IV de Fitzpatrick (>80%) e durante a idade fértil. As lesões são caracterizadas por máculas acastanhadas, com distribuição simétrica, contornos irregulares e limites nítidos.(3) Embora assintomático, o acometimento de áreas visíveis, em mulheres jovens e as recidivas frequentes (mesmo durante tratamento), geram significativo impacto no qualidade de vida.(4)

Apesar de sua patogênese ainda não ser completamente conhecida, sabe-se que o melasma decorre não apenas da hipertrofia dos melanócitos, mas de uma alteração em toda a unidade epidermo-melânica, fibroblastos e endotélio, com significativas alterações na derme superior e zona de membrana basal (ZMB).(5–7) Estudos clássicos da histologia do melasma investigaram apenas a pele acometida e pele adjacente, mas pouco se sabe do comportamento da pele fotoprotetida, que está sob influência dos mesmos fatores sistêmicos e genéticos.

A radiação ultravioleta (RUV) é o principal elemento extrínseco que regula a melanogênese, contudo, são pouco conhecidas as vias reguladoras intrínsecas. A exclusividade humana da melanogênese induzida por RUV retarda a investigação dessa fisiologia.(8)

No melasma, há aumento da expressão epidérmica de hormônio alfa estimulador de melanócitos (α MSH) e receptor de melanocortina 1 (MC1-R), o que propicia aumento de tirosinase e, em via final, da eumelanina. Há, porém, evidências que outros mediadores estejam envolvidos na melanogênese do melasma.(6)

A via do Wnt/ β -catenina (via canônica do Wnt) participa da diferenciação e desenvolvimento dos melanócitos a partir da crista neural, bem como da melanogênese em melanócitos adultos.(9–11) Wnt1 é um ligante dos receptores transmembrana de 7 domínios *Frizzled*, que, ao serem ativados, inibem a ativação de *glicogen* sintase kinase-3 (GSK-3), o que leva ao acúmulo e estabilização de β -catenina. Esta se transloca ao núcleo celular e regula a transcrição de genes alvo.(12,13) *In vitro*, um aumento na expressão de Wnt1 em cultura de células da crista neural é capaz de atuar de forma direta na linhagem melanocítica e em sua diferenciação, ao aumentar o número de melanoblastos e a conversão em melanócitos pigmentados.(14)

Dentre as diferentes famílias de moduladores da via Wnt, destaca-se o WIF-1 (fator 1 inibidor de Wnt), entretanto, sua atuação no melasma ainda é bastante divergente na literatura.(9,15)

A proteína ASIP é codificada pelo gene *agouti* e atua bloqueando a ativação do MC1-R e consequentemente, a eumelanogênese, entretanto seu papel no melasma ainda não foi

explorado.(16)

Este estudo objetivou avaliar características histológicas e ultraestruturais da pele com melasma, além de explorar a correlação entre as alterações morfológicas e a expressão epidérmica de Wnt1, WIF-1, ASIP na pele acometida, perilesional e retroauricular.

Métodos:

Estudo transversal com controle intra-sujeito, no qual foram incluídas 11 mulheres adultas (>18 anos) com melasma facial, fora de tratamento há mais de 30 dias, exceto por filtro solar, selecionadas por conveniência entre os casos novos do ambulatório de dermatologia da FMB-Unesp (Botucatu-SP, Brasil), no período de janeiro a junho de 2016. Não foram incluídas pacientes com doenças sistêmicas, gestantes ou sob anticoagulação.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição - no. 1.602.185 (**Anexo 1**). Cada participante foi submetida, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**anexo 2**), à retirada, sob anestesia local, de três fragmentos de pele por *punch* 3mm do melasma facial, pele sã adjacente (até 2 cm da pele com melasma) e pele retroauricular.

Fragmentos provenientes de dez participantes foram submetidos a colorações histoquímicas, imunomarcação para CD34 e à imunofluorescência direta (IFD) de dupla marcação. Já os três fragmentos provenientes de uma participante foram processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Colorações histoquímicas:

Os fragmentos foram fixados em formalina 10% tamponada, emblocados em parafina e processados para as colorações histoquímicas. Hematoxilina-eosina foi utilizada para avaliar as diferenças anatômicas entre os locais (compactação da camada córnea; espessura da córnea, do epitélio viável e da epiderme total), grau de elastose solar e quantificação da celularidade da derme superficial. Já a coloração de Fontana-Masson foi utilizada na análise da densidade de melanina, tanto na derme superficial quanto na epiderme. Através do ácido periódico de Schiff (PAS) foram avaliadas as alterações na zona de membrana basal e realizada a contagem de melanócitos que se projetam da camada basal em direção à derme (melanócitos em pêndulo)(17). Verhöff foi útil na avaliação do material elástico, enquanto picrosirius *red* foi necessário para avaliação do colágeno da derme superior. Por fim, azul de toluidina foi a coloração utilizada para evidenciar os mastócitos.

Áreas regulares, sem artefatos, interfoliculares, de cada corte histológico foram fotografadas em triplicata utilizando microscópio Coolscope II (Nikon Instruments Inc., Tokyo,

Japan, 2009). As imagens obtidas foram analisadas através do software ImageJ 1.51e de forma cega quanto à topografia.(18) O detalhamento da metodologia de avaliação quantitativa de cada variável analisada está disponível em material suplementar (**Anexo 3**).

Coloração imuno-histoquímica:

Para a avaliação dos componentes vasculares (vasos por campo de aumento 40x), utilizou-se a pesquisa do antígeno CD34 por imuno-histoquímica. Após desparafinização, os cortes foram hidratados e submetidos ao desmascaramento antigênico em panela de pressão elétrica por 20 minutos, utilizando solução tampão citrato (pH 6,0). Bloqueio da peroxidase endógena foi realizada em solução de H₂O₂ 6% por 30 minutos, protegida da luz. Após lavagem, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário policlonal goat anti-CD34 (C-18, sc-7045, Santa Cruz Biotechnology, Dallas-TX; USA), diluído em Soro Bovino Fetal (PBS) 1:100, em protocolo *overnight* (12 horas) em câmara úmida a 4°C. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário *rabbit anti-goat* (DAKO, P0449), diluído em PBS (1:2000), durante 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após lavagens em PBS, os cortes histológicos foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase (ADVANCE-HRP, DAKO, K4068), durante 30 minutos a 37°C. As lâminas foram reveladas com solução de Diaminbenzidina (DAB, Sigma), durante 5 minutos a 37°C. Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris.

Imunofluorescência direta de dupla marcação:

Foi realizada IFD de dupla marcação para as proteínas Wnt1, WIF-1 e ASIP epidérmicas. As padronizações dos protocolos de imunofluorescência dependeram da titulação da menor concentração de anticorpos principais capazes de serem detectadas nas lâminas de controles positivos (dados não mostrados). O protocolo para Wnt1 e ASIP envolveu desparafinização das lâminas, desmascaração antigênica com lâminas mantidas submersas em solução de citrato aquecidas em 3 ciclos de 5 minutos em forno microondas. Após resfriamento e lavagem, o bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com leite de vaca a 1%. Após lavagem, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário. O anticorpo anti-ASIP *rabbit* policlonal (ab151033, Abcam, Cambridge - MA, EUA) foi diluído em PBS a 1:1000; já o anticorpo anti-Wnt1 (ab15251, Abcam, Cambridge - MA, EUA) foi diluído a 1:100. Ambos foram mantidos em incubação no protocolo *overnight* (12 horas) em câmara úmida a 4°C. Após lavagem, o anticorpo secundário Alexa Fluor® 594 dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham - MA, USA) diluído em PBS (1:500), durante 30 minutos, em câmara úmida a 37°C, em ambiente escuro. A contracoloração foi realizada com DAPI para marcação nuclear (cor verde).

A desmascaração antigênica para marcação do WIF-1 foi realizada por aquecimento em

ebulidor por 30 minutos, estando as lâminas submersas em solução Trilogy® (Cell Marque, 1:20); o bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com leite de vaca a 5% e o anticorpo anti-WIF-1 *rabbit* policlonal (ab186845, Abcam, Cambridge - MA, EUA) diluído a 1:100 em PBS, foi mantido em incubação com as lâminas por 2 horas.

As áreas de maior marcação das lâminas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX41, resultando em imagens tipo *TIFF com 1280x1024 pixels (24 bits de cor).(18,19) A intensidade de marcação da epiderme (excetuando a camada córnea, nos casos de auto-fluorescência) foi analisada com o software ImageJ v1.51e (variação de 0 a 255 tons de cinza) para os diferentes canais de cor. A avaliação foi cega quanto à topografia em questão.

Microscopia Eletrônica de Transmissão:

Três fragmentos oriundos de uma das participantes foram fixados em glutaraldeído 2,5%, pós-fixado em Ósmio 2% e processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em cortes ultrafinos (50-60nm). Foi utilizado o Microscópio Eletrônico Tecnai *Spirit* - FEI *Company*, a fim de avaliar a integridade da membrana basal, estrutura da lâmina densa e organelas citoplasmáticas nos sítios de interesse.

Análise estatística:

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.(20)

Os dados foram comparados entre as topografias utilizando modelo linear generalizado de efeitos mistos, com estrutura de covariância robusta, distribuição de probabilidade ajustada a cada amostra (normal ou gama) e análise *post-hoc* pelo algoritmo de Sidak sequencial.(21)

As variáveis que apresentaram significância à análise bivariada foram testadas quanto a sua correlação pelo teste de Spearman, e posteriormente incluídas em um modelo exploratório multivariado de análise de correspondência múltipla.(21,22)

Dados faltantes (<10% da amostra) foram estimados por técnica de imputação múltipla (10 iterações) para as análises de correlação e multivariada. Dados *outliers* foram definidos como os que ultrapassaram 1,5x o desvio interquartilico acima ou abaixo do terceiro e primeiro quartis, e sofreram winsorização.(21,23,24)

A análise foi realizada no software IBM SPSS 22 e a significância definida para $p \leq 0,05$. O dimensionamento amostral para 10 pacientes (30 amostras) se baseou na expectativa de diferença entre as topografias de mais de 50% das expressões entre as peles (amostras dependentes), com alfa 0,05 e beta 0,2.(25)

Resultados:

As 11 mulheres amostradas apresentavam idade média (desvio-padrão) de 42,9 (8,9) anos, tempo de melasma de 16,7 (7,9) anos e fototipos III ou IV de Fitzpatrick.

Os principais resultados da análise imuno e histomorfométrica estão apresentados na **tabela 1**. Destaca-se o adelgaçamento da camada córnea nos fragmentos mais fotoexpostos – pele com melasma e adjacente sã - (**figura 1**), entretanto com maior compactação córnea no melasma do que nas duas outras topografias. Houve aumento progressivo da pigmentação melânica epidérmica entre as topografias (menor na pele retroauricular, intermediária na pele sã adjacente e mais densa no melasma), mas não houve diferença quanto à densidade de melanina dérmica entre as topografias (**figura 1**). A elastose solar foi mais proeminente nas peles mais fotoexpostas, especialmente no melasma (**figuras 1 e 2**), assim como houve maior heterogeneidade do colágeno na derme papilar da pele com melasma comparada com os demais sítios (**figura 2**). Também houve maior número de falhas da integridade da ZMB (**figura 3**) no melasma, ao compararmos com a pele perilesional e retroauricular. Melanócitos em pêndulo (**figura 3**) foram mais frequentes no melasma e na pele fotoexposta, assim como a celularidade dérmica, estruturas vasculares (maior número e dilatação) (**figura 3**) e o número de mastócitos (**figura 4**).

A avaliação quantitativa da IFD evidenciou maior intensidade de marcação citoplasmática epidérmica para a proteína Wnt1 na pele com melasma em relação à pele adjacente, bem como maior marcação na pele retroauricular em comparação com a pele sã adjacente. Não houve diferença quanto à intensidade de marcação de WIF-1 e ASIP entre as topografias analisadas (**tabela 1 e figura 5**).

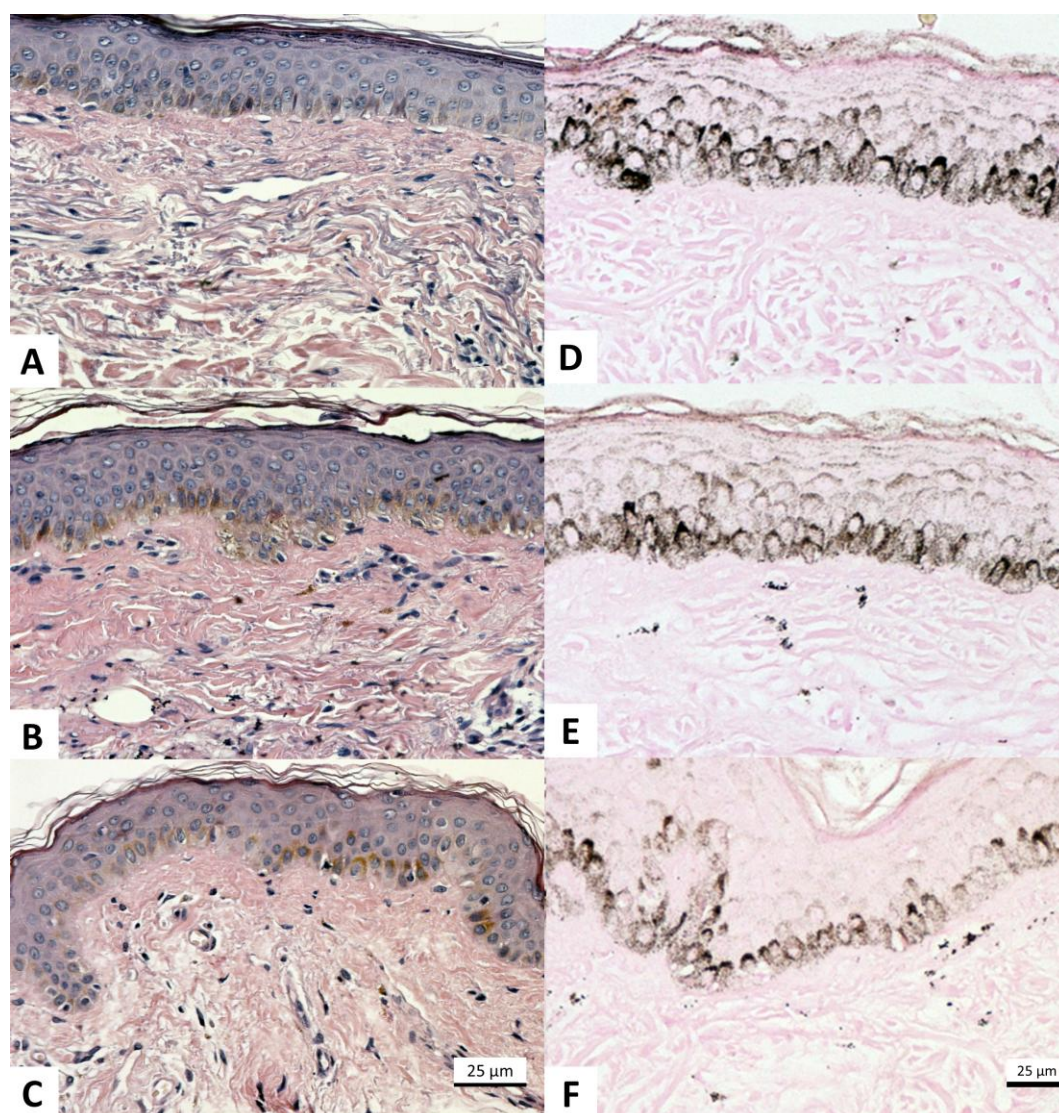


Figura 1. À coloração de Hematoxilina-Eosina, nota-se adelgaçamento da camada córnea na pele com melasma (A) e adjacente (B), sendo a compactação maior no melasma. A elastose solar apresentou aumento progressivo entre as topografias, sendo maior no melasma (A) do que na adjacente (B) e pele retroauricular (C). Já à coloração de Fontana-Masson, evidencia-se que a pigmentação melânica epidérmica apresentou aumento progressivo entre as topografias, sendo maior no melasma (D) do que na adjacente (E) e pele retroauricular (F). Não houve diferença quanto a densidade da melanina na derme.

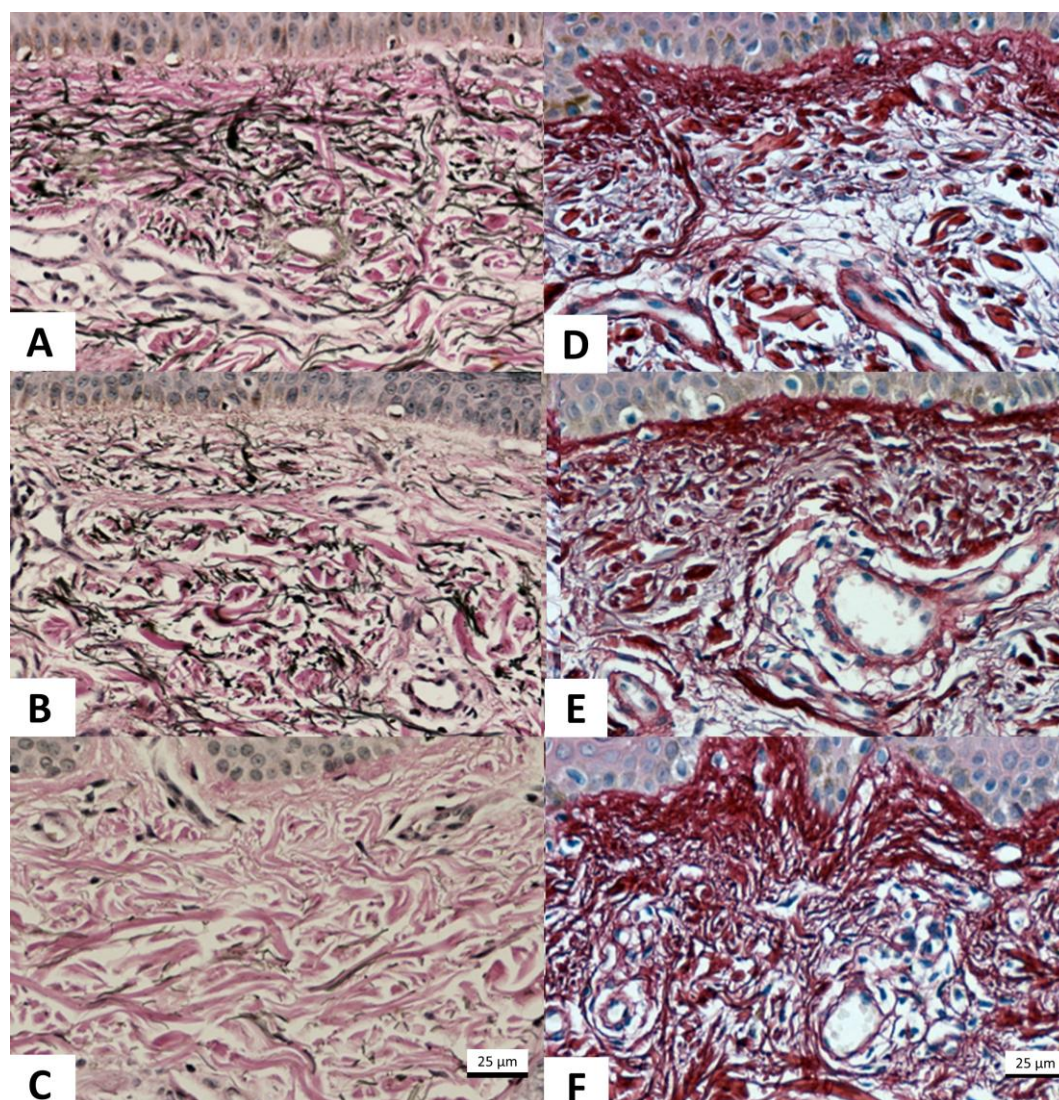


Figura 2. Pele com melasma (A), adjacente (B) e retroauricular (C) coradas por Verhöff: material elastótico foi mais proeminente nas peles mais fotoexpostas, especialmente no melasma (A). Coloração de Picrosirius *red* evidenciou maior heterogeneidade do colágeno na derme papilar da pele com melasma (D) comparada à pele retroauricular (E) e adjacente (F).

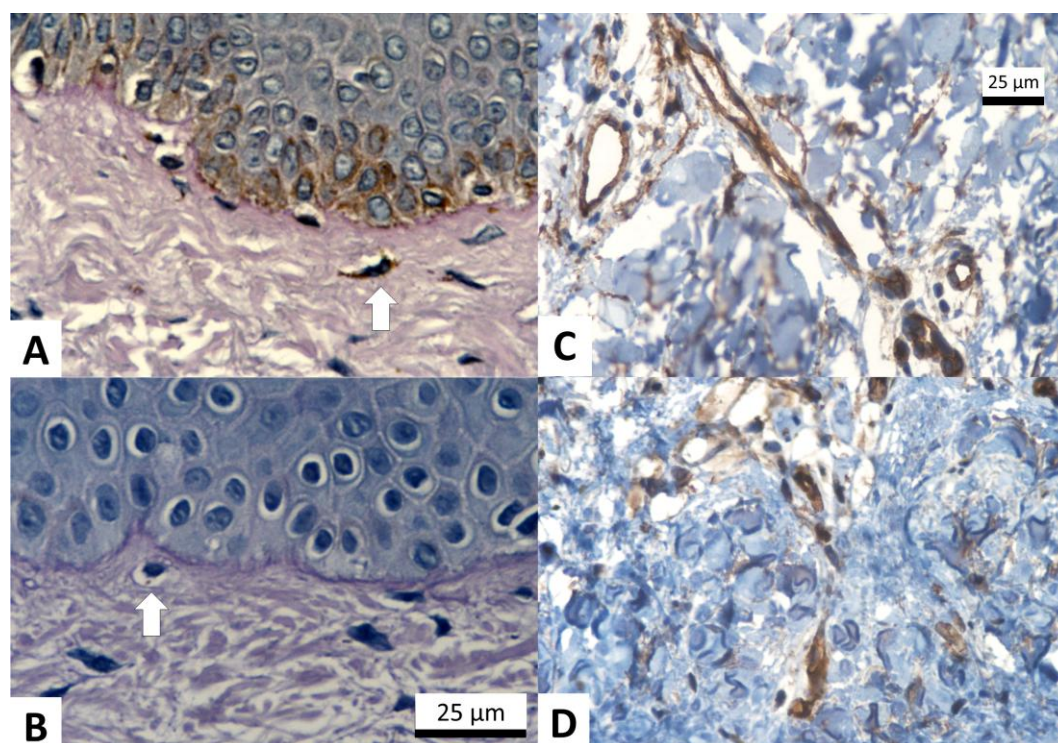


Figura 3. Melanócitos em pêndulo (setas), além de alterações da espessura e da continuidade da membrana basal mais evidentes na pele com melasma (A) que na pele retroauricular (B), coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Nas imagens C e D, estruturas vasculares CD34 positivas à imunohistoquímica na derme superficial. Na pele com melasma (C), há maior quantidade de vasos que na pele sã perilesional (D), além de luzes vasculares com maior diâmetro.

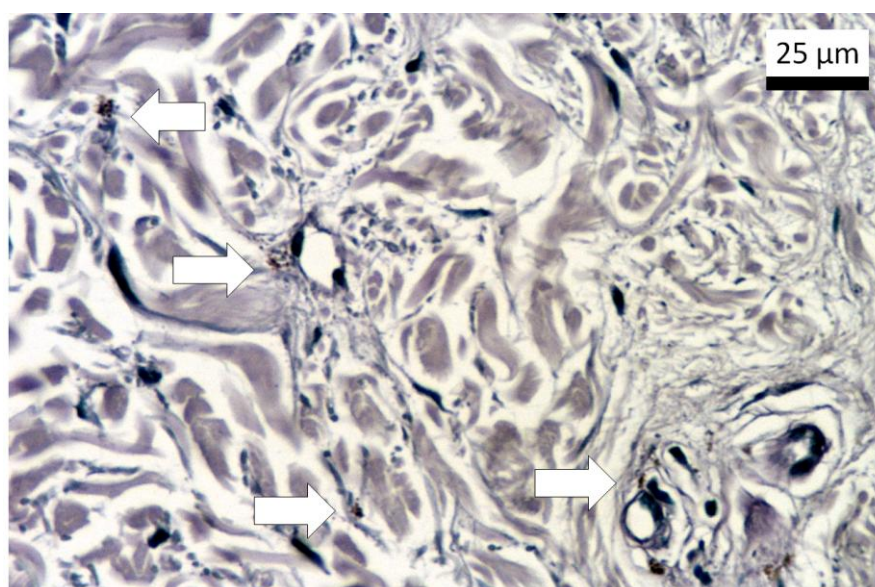


Figura 4. Mastócitos na derme superficial (setas) da pele com melasma, dispostos preferencialmente em topografia perivascular, com grânulos metacrômicos (púrpura) à coloração de azul de toluidina.

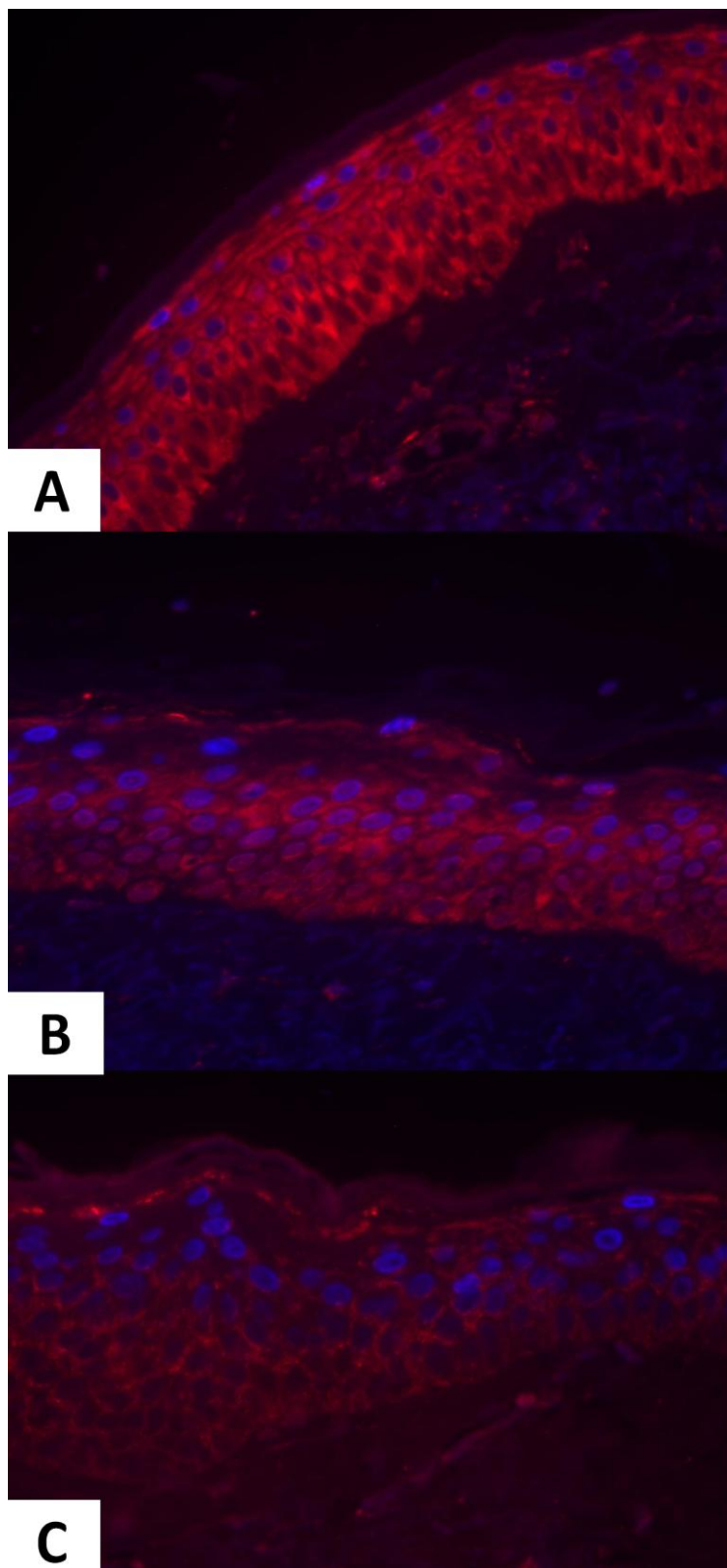


Figura 5. Pele acometida por melasma (A), pele sã adjacente (B) e retroauricular (C) à IFD de dupla marcação para Wnt1 (vermelho - marcação citoplasmática para Wnt1; azul - marcador nuclear DAPI).

Tabela 1. Medidas imuno e histomorfométricas dos pacientes com melasma, de acordo com as topografias estudadas (n=10).

Variáveis	Melasma	Adjacente	Retroauricular	p
H & E				
Espessura do estrato córneo (micra)*	13,4 (4,2)	13,3 (3,7)	18,1 (5,3) ^{a,b}	<0,01
Espessura do epitélio viável (micra)*	58,8 (9,7)	55,2 (10,9)	53,1 (9,6)	0,59
Espessura da epiderme total (micra)*	72,1 (11,0)	69,6 (15,1)	71,2 (11,9)	0,91
Compactação da camada córnea (qualitativo)**@	1 (1-2)	1 (0-1) ^a	0 (0-0) ^{a,b}	<0,01
Elastose solar (qualitativo)**#	1 (1-2)	0 (0-1) ^a	0 (0-0) ^{a,b}	<0,01
Celularidade da derme superficial (campo de 40x)*	53,6 (7,5)	45,4 (6,2) ^a	37,7 (6,6) ^{a,b}	<0,01
Fontana-Masson				
Densidade de melanina epidérmica*	0,35 (0,06)	0,32 (0,08) ^a	0,25 (0,08) ^{a,b}	<0,01
Densidade de melanina dérmica (x100)**	0,19 (0,06-0,75)	0,25 (0,20-0,35)	0,25 (0,16-0,45)	0,82
PAS				
Falhas na ZMB (número/campo de 40x)*	2,1 (0,6)	1,7 (0,8) ^a	1,0 (0,5) ^{a,b}	<0,01
Melanócitos em pêndulo (número/campo de 40x)**	2,7 (2,7-3,3)	1,3 (1,3-3,0) ^a	1,3 (1,0-1,7) ^a	<0,01
Verhóff				
Densidade de material elastótico na derme superior*	0,29 (0,07)	0,25 (0,04) ^a	0,19 (0,04) ^{a,b}	<0,01
Picrosirius red				
Densidade do colágeno na derme superior*	0,63 (0,09)	0,68 (0,07)	0,66 (0,06)	0,15
Homogeneidade do colágeno (dimensão fractal)*	1,53 (0,02)	1,56 (0,04) ^a	1,57 (0,03) ^a	<0,01
Azul de toluidina				
Mastócitos por campo (número/campo de 40x)*	6,4 (1,5)	3,6 (0,7) ^a	2,5 (0,8) ^{a,b}	<0,01
CD34				
Vasos por campo (número/campo de 40x)*	6,8 (1,4)	4,3 (0,8) ^a	4,5 (1,5) ^a	<0,01
Wnt1 (intensidade de marcação)*	67 (29)	54 (30) ^a	57 (32) ^b	0,02
WIF-1 (intensidade de marcação)*	68 (17)	66 (17)	60 (33)	0,81
ASIP (intensidade de marcação)*	20 (8)	19 (4)	17 (6)	0,70

* média (desvio-padrão); ** mediana (p25-p75); ^a p<0,05 em relação ao melasma; ^b p<0,05 em relação à pele adjacente (perilesional)

@ 0 = ausência de compactação da córnea; 1 = compactação leve a moderada da córnea; 2 = compactação importante da córnea.

0 = ausência de elastose solar; 1 = elastose solar leve a moderada; 2 = intensa elastose solar.

À MET, a pele com melasma apresentou maior quantidade de áreas danificadas na ZMB: falhas, descontinuidades e menor densidade da lâmina densa. Além disso, maior número de organelas citoplasmáticas nos queratinócitos basais e melanócitos (**figura 6**). Seus melanossomas eram mais maduros (estágio IV), enquanto nas outras duas áreas apresentavam-se nos estágios II e III (**figura 6**).

A correlação entre as variáveis histológicas está disposta na tabela 2. Destaquem-se a compactação da camada córnea, celularidade da derme superficial, densidade de mastócitos e elastose solar como as variáveis mais correlatas com as demais. Wnt apresentou correlação com a densidade de mastócitos na derme superficial.

O mapa perceptual da análise de correspondência múltipla (**figura 7**) incluiu 13 variáveis, permitindo a explicação de 65% da variância do modelo com dois componentes. As variáveis que mais se correlacionaram com as topografias faciais foram a elastose solar, heterogeneidade do colágeno, celularidade da derme, contagem de mastócitos, ocorrência de melanócitos em pêndulo, presença de estruturas vasculares, alterações nas fibras elásticas, Wnt. A associação preferencial com melasma ocorreu com a contagem de mastócitos, celularidade na derme superficial e material elastótico.

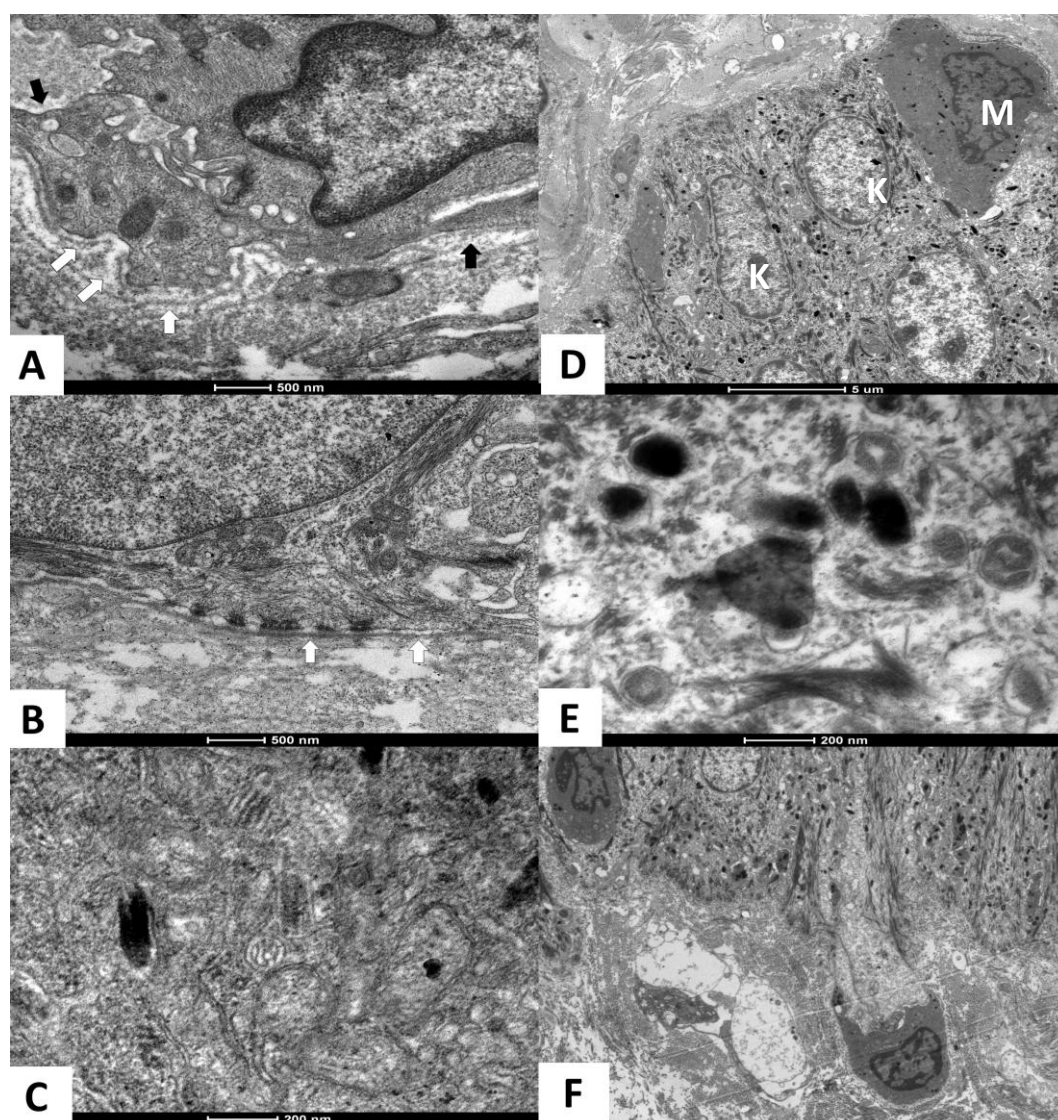


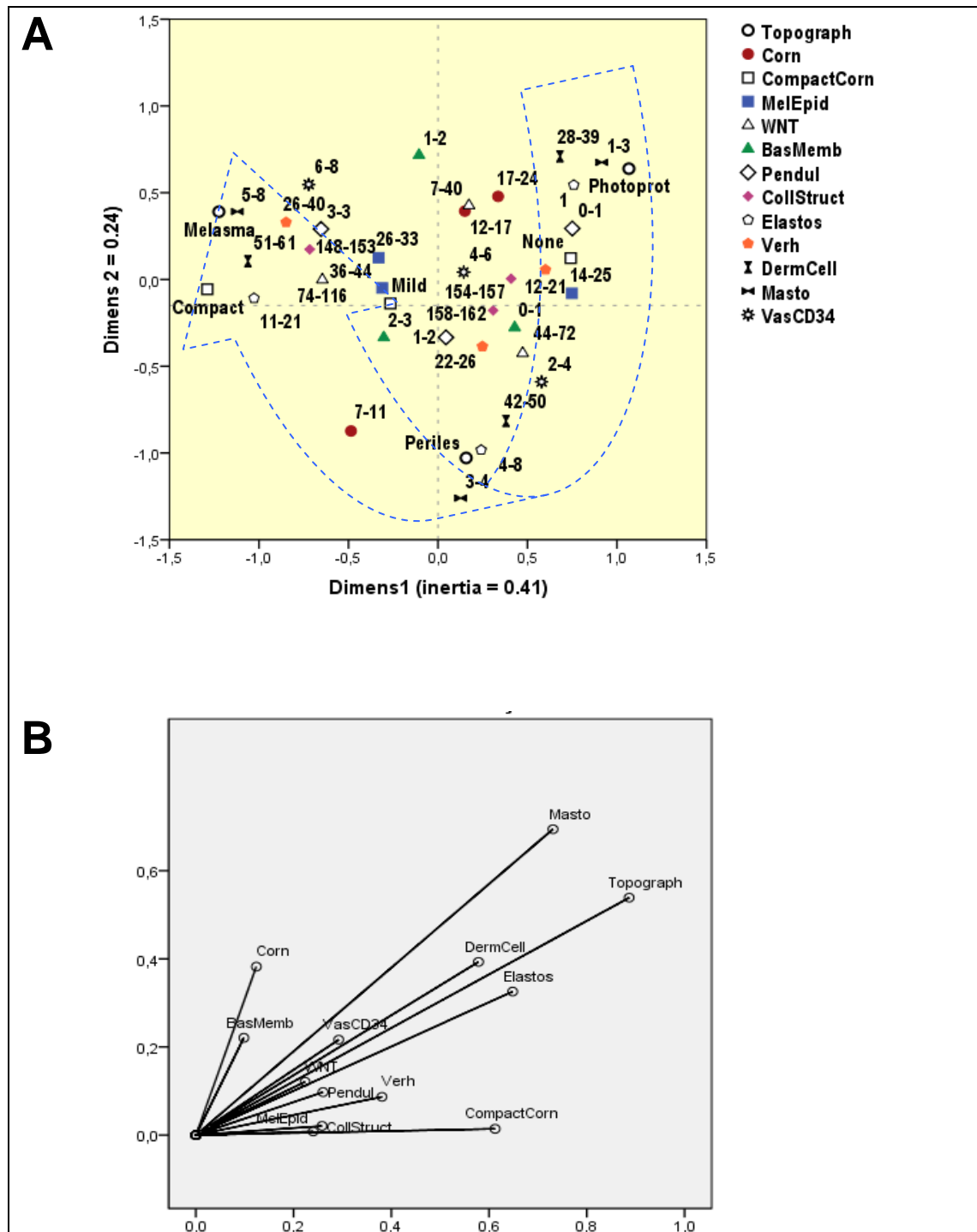
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) na pele com melasma. Setas claras nas figuras A e B indicando os locais de fragmentação da lâmina densa e setas escuras mostram completa desestruturação. A figura C evidencia a densidade aumentada de organelas citoplasmáticas nos queratinócitos (mitocôndrias e retículo endoplasmático). Na pele com melasma, há grande quantidade de melanossomas maduros (III e IV) nos queratinócitos (D e E). M significa melanócitos e K, queratinócitos. Na imagem F é possível visualizar a projeção de um melanócito em direção à derme (melanócito em pêndulo).

Tabela 2. Correlação (rho de Spearman) das medidas histomorfométricas dos dez pacientes com melasma.

	Corn	CompactCorn	Verh	Elastos	CollHomog	DermCell	BasMemb	Masto	VasCD34	Pendul	Wnt1
MelEpid	-0,36	0,19	-0,05	0,23	-0,16	0,41	0,25	0,37	0,45	0,04	-0,23
Corn		-0,31	-0,11	-0,23	0,02	-0,38	-0,36	-0,15	-0,04	-0,24	-0,07
CompactCorn			0,60	0,57	-0,16	0,58	0,13	0,51	0,15	0,60	0,18
Verh				0,54	-0,27	0,27	-0,15	0,46	0,11	0,53	-0,06
Elastos					-0,39	0,43	0,17	0,66	0,41	0,37	0,30
CollHomog						-0,30	-0,10	-0,47	-0,20	-0,18	0,00
DermCell							0,37	0,70	0,27	0,30	0,32
BasMemb								0,29	0,27	0,11	0,24
Masto									0,45	0,49	0,40
VasCD34										0,26	-0,07
Pend											0,09

Negrito: $p \leq 0,05$.

Corn: espessura da camada córnea; CompactCorn: compactação da camada córnea; Verh: avaliação das fibras elásticas por meio da coloração de Verhoeff; Elastos: elastose solar; CollHomog: heterogeneidade do colágeno na derme superior; DermCell: celularidade na derme superficial; BasMemb: densidade de lesões da membrana basal; Masto: densidade de mastócitos na derme superficial; VasCD34: densidade de vasos na derme superficial; Pendul: densidade de melanócitos pêndulos; Wnt: marcação para anticorpo anti-Wnt na epiderme; MelEpid: densidade da melanina na epiderme.



Topograph: topografia das lesões; Corn: espessura da camada córnea; CompactCorn: compactação da camada córnea; MelEpid: melanina na epiderme; WNT: densidade de marcação por anticorpo anti-Wnt1 na epiderme; BasMemb: densidade de lesões da membrana basal; Pendul: densidade de melanócitos pêndulos; CollStruct: heterogeneidade do colágeno na derme superior; Elastos: elastose solar; Verh: avaliação das fibras elásticas por meio da coloração de Verhoeff; DermCell: celularidade na derme superficial; Masto: densidade de mastócitos na derme superficial; VasCD34: densidade de vasos na derme superficial.

Figura 7. Análise de correspondência múltipla (A) das variáveis histológicas estudadas no melasma, pele adjacente e retroauricular. Medidas de associação multidimensional (B).

Discussão:

Foram identificadas diferenças histológicas e ultraestruturais entre a pele com melasma facial, perilesional e retroauricular. A comparação entre as três áreas constitui um modelo que permite inferir o papel de estímulos ambientais e elementos intrínsecos como as influências genética e hormonais, na patogênese do melasma.(6)

Na pele com melasma e perilesional, houve adelgaçamento da camada córnea, já sua compactação foi mais evidente no melasma em comparação aos outros epitélios. Estudos evidenciaram que o fotoenvelhecimento é responsável pela diminuição da espessura da epiderme e maior compactação da córnea, entretanto, a diferença em relação à compactação córnea entre a pele com melasma e perilesional – ambas fotoexpostas – favorece a hipótese de que o melasma esteja associado a um maior dano à barreira cutânea.(26)

A pele com melasma apresenta *downregulation* da expressão dos genes envolvidos no metabolismo dos lipídios, tais como receptor alfa do ativador da proliferação de peroxissomo (PPAR), coativador 1 α do PPAR- γ , diacilglicerol o-acetiltransferase 2-like3, aracnidonato 15-lipoxigenase.(27,28) A compactação da camada córnea representa uma desordem estrutural na pele que, associada à alteração funcional no metabolismo lipídico, são causas primordiais no dano à barreira cutânea, integridade funcional da camada córnea e atraso na recuperação em sua função de barreira.(29,30)

A densidade de melanina epidérmica aumentou progressivamente em função da topografia estudada, evidenciando o papel da RUV na melanogênese cutânea, sendo que a UVA é capaz de induzir aumento no número, tamanho e atividade dos melanócitos epidérmicos, além de alterar o padrão de melanogênese por tempo prolongado.(31) Entretanto, a maior síntese localizada na pele com melasma em relação à perilesional, sugere haver um microambiente que favoreça a melanogênese focal em uma área com similar irradiação de RUV.

A densidade de melanina epidérmica apresentou correlação com o número de células na derme superior, presença de estruturas vasculares e mastócitos, indicando que estímulos dérmicos exerçam papel na melanogênese do melasma. Na hiperpigmentação pós-inflamatória e na mastocitose cutânea (urticária pigmentosa), ocorre pigmentação melânica independentemente da RUV, o que suporta a hipótese que a melanogênese no melasma tenha origem da integração de fenômenos independentes, configurando um modelo individualizado de pigmentação.(32)

A ausência de diferença significativa da densidade de pigmento melânico na derme entre as topografias torna inexata a classificação do melasma em epidérmico, dérmico ou misto à luz de Wood. O derrame pigmentar é um achado próprio do envelhecimento intrínseco, independente da

fotoexposição, e, apesar do padrão de atenuação à luz de Wood ser indicativo da resposta terapêutica no melasma, isso parece estar desvinculado do processo fisiopatológico subjacente.(2,3,28)

O número de melanócitos em pêndulo apresentou significativa progressão em decorrência da região da pele avaliada. Tal achado, era creditado à lesão da ZMB e diminuição do colágeno IV, em áreas fotoexpostas, porém, nossos dados sugerem que outros elementos possam contribuir para esse fenômeno.(33) A densidade de melanócitos em pêndulo apresentou correlação com a compactação da camada córnea, elastose solar, presença de mastócitos e alterações do material elastótico avaliadas pela coloração Verhoeff, mas não com o número de falhas na ZMB. Ademais, a exposição experimental da pele fotoprotetida à UVA, desencadeia melanogênese sustentada, elastose solar, danos às fibras colágenas, protusão dos melanócitos em direção à derme, reproduzindo alterações semelhantes às encontradas no melasma.(31)

As alterações fisiopatológicas do melasma não envolvem apenas a epiderme. Na derme superficial, a maior elastose solar nas áreas fotoexpostas (melasma e adjacente) decorrem da exposição crônica à RUV, entretanto, uma vez que há diferença significativa entre o grau de elastose da pele com melasma *versus* adjacente, leva a hipótese que este não seja apenas um epifenômeno secundário do fotoenvelhecimento, mas sim condição importante para o desenvolvimento do melasma.

A RUV, especialmente UVA, é capaz de induzir a produção de citocinas melanogênicas – tais como fator de crescimento de hepatócitos e fator estimulador de *stem cell* (SCF), – e metaloproteinases (MMP) diretamente a partir dos fibroblastos dérmicos, além da promoção de óxido nítrico sintase induzida e estresse oxidativo local.(7,28,34–36) Elastose solar apresentou correlação com heterogeneidade do colágeno, celularidade na derme superficial, mastócitos e vasos dérmicos, melanócitos em pêndulo, compactação da córnea e lesão das fibras elásticas, sugerindo sua integração com os diversos elementos fisiopatológicos do melasma.

O incremento na celularidade dérmica no melasma em comparação com área perilesional e retroauricular pode decorrer do processo inflamatório e dano oxidativo.(6) A radiação UVB é capaz de estimular a secreção de citocinas, tais como endotelina-1, interleucina-1, óxido nítrico, SCF, fator estimulador de colônia de granulócito/mastócito e α MSH, que estimulam a mitose de melanócitos ou melanogênese. A secreção de prostaglandina E2, tromboxano B2 e leucotrieno C4 também induzem melanócitos maiores e com mais dendritos, assim como melanogênese, independentemente da secreção de α MSH. (34,37–41)

O maior número de mastócitos na derme com melasma já havia sido descrito por outros autores, entretanto, sua densidade progride em função do fotodano em áreas fotoexpostas.(7,39,42)

A histamina secretada pelos mastócitos estimula proliferação e migração de melanócitos, por meio da ativação da proteína *kinase A* via receptores H2, sendo um estimulador direto da melanogênese, como ocorre na urticária pigmentosa.(43,44)

Mastócitos induzem a produção de elastina pelos fibroblastos através da secreção de mediadores parácrinos e fatores quimiotáticos – como histamina, leucotrienos, prostaglandinas e proteases, que participam do processo de reparo crônico.(39,45) Além disso, produzem triptase, que transforma as pro-MMP em MMP ativas, que participam do dano à matriz extracelular e membrana basal, influenciando a ocorrência dos melanócitos pêndulos, com que se correlacionou neste estudo. (46–48)

A pele com melasma apresenta ainda maior quantidade de estruturas vasculares, que se mostraram correlatas à elastose solar, mastócitos e pigmentação epidérmica. A angiogênese pode ser estimulada pela RUV, secreção de fator de crescimento de fibroblasto, IL-8, e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) – mais expresso na pele com melasma do que na perilesional.(17,49,50) Apesar do VEGF ser sintetizado pelos queratinócitos e, *in vitro*, já terem sido identificados receptores nos melanócitos, faltam estudos que evidenciem sua ação direta na melanogênese do melasma.(7,51) A endotelina 1, cuja produção ocorre pelas células endoteliais e células inflamatórias, promove *upregulation* de genes-chave na melanogênese, como tirosinase e fator de transcrição relacionado a microftalmia. O estímulo melanogênico induzido pelo endotélio é ainda mais intenso após exposição à RUV, fortalecendo seu papel fisiopatológico no melasma.(52)

A via Wnt engloba uma grande família de proteínas envolvidas em diferentes funções celulares. Em sua via principal (canônica), proteínas Wnt se ligam ao seu receptor *Frizzled* (Fzd) e correceptor Lrp (proteína relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade) 5/6, bloqueando a degradação da β -catenina citoplasmática. Esta se desloca para o núcleo celular, onde é capaz de interferir na transcrição do DNA, induzindo migração, proliferação e diferenciação celular.(53) Wnt1 é uma proteína encontrada exclusivamente no citoplasma celular pela endocitose do complexo Wnt1/ligante e se trata da principal ativadora da via canônica do Wnt.(54,55)

Na pele sem distúrbios de pigmentação, a RUV do tipo B parece ser capaz de intensificar a pigmentação epidérmica ao promover *upregulation* de Wnt7a que, através da translocação nuclear da β -catenina, promove diferenciação de *stem cell* precursor de melanócito em melanoblastos no folículo piloso. Estes, migram para a epiderme, proliferam e induzem pigmentação.(53) Já no paciente com melasma, esta dinâmica parece estar alterada. A maior expressão citoplasmática de Wnt1 na pele com melasma do que na pele sã adjacente, somada à maior intensidade de marcação na pele retroauricular em comparação com a pele sã adjacente sugerem um fenótipo individualizado do melasma em relação à pele adjacente. Kim em seus colaboradores, em 2013, também

encontraram maior expressão de Wnt1 e Wnt5a no melasma que no controle.(15)

Nas células de câncer de mama, o estrógeno promove *upregulation* de Wnt1.(54,56) No melasma, esteroides sexuais são conhecidos fatores desencadeantes. Além disso, há aumento da expressão nuclear de receptores de estrógenos em relação à pele adjacente, o que pode indicar a coparticipação desses elementos no melasma.(57)

Wnt é uma via protooncogênica que participa ativamente do processo de reparo tecidual e é capaz de recrutar *stem cells* a fim de resolver o dano ao epitélio.(58) Na medula óssea, Wnt5a promove a maturação de mastócitos.(59) Esta correlação entre mastócitos e via Wnt nunca havia sido explorada na pele e parece decorrer do microambiente inflamatório e de lesão tecidual crônica que ocorre no melasma, deflagrando ativação inapropriada e prolongada da sinalização Wnt.(58)

WIF-1, inicialmente descrita como antagonista da via canônica da família Wnt, ainda não tem sua função claramente conhecida.(9) A literatura acumula resultados conflitantes. Kim e colaboradores, evidenciaram, em cultura celular, diminuição da expressão de WIF-1 na pele com melasma. No ano seguinte, Park e colaboradores apontaram aumento de WIF-1 na pele com melasma também em cultura.(9,15) Entretanto, ao compararmos pele com melasma, pele sã adjacente e pele retroauricular não houve diferença estatística significativa entre as topografias analisadas, o que sugere que WIF-1 não participe da fisiopatologia do melasma.

MC1-R e seus ligantes, α MSH e ASIP regulam a relação entre eumelanina/feomelanina. ASIP é capaz de se ligar ao MC1-R, promovendo antagonismo competitivo ao α MSH e inibição das vias de sinalização para eumelanogênese.(2,60,61) Na ausência de α MSH, ASIP atua como agonista inverso de MC1-R.(60,62) Apesar de ASIP inibir a produção de AMPc nas células que expressam α MSH, culturas de melanócitos que foram submetidas a estímulo com ASIP não foram capazes de induzir feomelanogênese, o que confirma que o ambiente *in vitro* não representa de maneira fidedigna o microambiente *in vivo*.(60) Nenhum estudo havia investigado a participação da proteína ASIP no melasma. A ausência de diferença entre a expressão proteica desta proteína na epiderme da pele acometida, pele sã adjacente e pele retroauricular indica que ASIP não participe das vias melanogênicas do melasma.

A análise ultraestrutural evidenciou atividade metabólica intensa na pele com melasma, o que decorre da necessidade de suprir as demandas dos queratinócitos e melanócitos que estão envolvidos na sua fisiopatologia.(3) Além disso, houve dano estrutural à lamina lúcida, concernente às falhas da ZMB e que favorece o trânsito de mediadores inflamatórios, bem como de fatores de crescimento melanogênicos oriundos da derme para os melanócitos.

A ZMB cutânea é sintetizada em conjunto pelos queratinócitos e pelos fibroblastos, e exerce papel importante na homeostase da epiderme. No fotoenvelhecimento, há a liberação de plasmina

pelos queratinócitos e a formação de espécies reativas de oxigênio, que, quando em excesso, se ligam ao superóxido para formar peroxinitrito,(63,64) capaz de ativar a MMP-2, que digere o colágeno IV da membrana basal, promovendo a ocorrência de falhas, descontinuidades e perda da integridade da ZMB.(65,66) Esse fenômeno está intimamente ligado ao processo de fotoenvelhecimento, porém, está exacerbado no melasma, evidenciando maior atividade colagenolítica da derme superior causando desordem do colágeno, elastose solar e dano à ZMB.(67)

Este estudo apresenta potenciais limitações, inicialmente ligados à amostra de mulheres exclusivamente oriundas de hospital público de uma única cidade do Brasil, o que não permite a generalização dos resultados para outros grupos populacionais, homens ou de melasma extrafacial. O uso da pele retroauricular como modelo de fotoproteção não é isento de críticas, apesar de que se preste à comparação com a pele perilesional como um *continuum* de fotoexposição. Posteriormente, o número restrito de participantes, que apesar de ter apresentado poder estatístico adequado, impede a análise de subgrupos.

Conclusão:

Além da hipertrofia melanocítica, a pele com melasma apresenta alterações na barreira epidérmica, na derme superior, ZMB e quanto à ativação da via Wnt, que diferem da pele fotoexposta adjacente e retroauricular, configurando um fenótipo individualizado, e não somente uma extensão do fotoenvelhecimento ou do envelhecimento intrínseco.

Referências:

1. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol.* 2014;89(5):771–82.
2. Miot LDB, Miot HA, Silva MG da, Marques MEA. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol.* 2009;84(6):623–35.
3. Miot LDB, Miot HA, Silva MG da, Marques MEA. Morphological and functional comparative study of melanocytes in melasma lesions. *An Bras Dermatol.* 2007;82(6):529–34.
4. Maranzatto CFP, Miot HA, Miot LDB, Meneguim S. Psychometric analysis and dimensional structure of the Brazilian version of melasma quality of life scale (MELASQoL-BP). *An Bras Dermatol.* 2016;91(4):422–8.
5. Brianezi G, Handel AC, Schmitt JV, Miot LDB, Miot HA. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(4):809–12.
6. Miot LD, Miot HA, Poletini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol.* 2010;32(7):676–82.
7. Kwon S-H, Hwang Y-J, Lee S-K, Park K-C. Heterogeneous pathology of melasma and its clinical implications. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6).
8. Videira IF dos S, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013;88(1):76–83.
9. Park TJ, Kim M, Kim H, Park SY, Park K-C, Ortonne J-P, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(1):72–81.
10. Fang D, Leishear K, Nguyen TK, Finko R, Cai K, Fukunaga M, et al. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006;24(7):1668–77.
11. Novak A, Dedhar S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(5–6):523–37.

12. Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology Review: WNT/Frizzled signalling: receptor–ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance. *Br J Pharmacol*. 2014;171(5):1195–209.
13. Covarrubias AA, Yeste M, Salazar E, Ramirez-Reveco A, Rodriguez Gil JE, Concha II. The Wnt1 ligand/Frizzled 3 receptor system plays a regulatory role in the achievement of the “in vitro” capacitation and subsequent “in vitro” acrosome exocytosis of porcine spermatozoa. *Andrology*. 2015;3(2):357–67.
14. Dunn KJ, Williams BO, Li Y, Pavan WJ. Neural crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(18):10050–5.
15. Kim J-Y, Lee T-R, Lee A-Y. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):191–200.
16. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. 1994;371(6500):799–802.
17. Kim EH, Kim YC, Lee E-S, Kang HY. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci*. 2007;46(2):111–6.
18. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–5.
19. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013; Chapter 14:Unit14.15.
20. Miot HA. Assessing data normality in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras*. 2017; 16(2). [Ahead of print].
21. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials*. 4th ed. Shelton (CT):PMPH-USA;2014.
22. Pereira JCR. Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais [Internet]. EDUSP;1999.
23. Mackinnon A. The use and reporting of multiple imputation in medical research - a review. *J Intern Med*. 2010;268(6):586–93.
24. Weichle T, Hynes DM, Durazo-Arvizu R, Tarlov E, Zhang Q. Impact of alternative approaches to assess outlying and influential observations on health care costs. *Springerplus*. 2013; 2: 614.
25. Miot HA. Sample size in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras*. 2011;10(4):275–8.
26. Bhawan J, Andersen W, Lee J, Labadie R, Solares G. Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. *J Cutan Pathol*. 1995;22(2):154–9.
27. Kang HY, Suzuki I, Lee DJ, Ha J, Reiniche P, Aubert J, et al. Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1692–700.
28. Kang WH, Yoon KH, Lee E-S, Kim J, Lee KB, Yim H, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol*. 2002;146(2):228–37.
29. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park K-C, Ortonne J-P, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1533–7.
30. Sarkar R, Arora P, Garg VK, Sonthalia S, Gokhale N. Melasma update. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(4):426–35.
31. Bacharach-Buhles M, Lubowitzki M, Altmeyer P. Dose-dependent shift of apoptotic and unaltered melanocytes into the dermis after irradiation with UVA 1. *Dermatol Basel Switz*. 1999;198(1):5–10.
32. Davis EC, Callender VD. Postinflammatory hyperpigmentation. *J Clin Aesthetic Dermatol*. 2010;3(7):20–31.
33. Lee D, Park K-C, Ortonne J, Kang H. Pendulous melanocytes: a characteristic feature of melasma and how it may occur. *Br J Dermatol*. 2012;166(3):684–6.
34. Imokawa G, Yada Y, Morisaki N, Kimura M. Biological characterization of human fibroblast-derived mitogenic factors for human melanocytes. *Biochem J*. 1998;330(3):1235–9.
35. Grichnik JM, Burch JA, Burchette J, Shea CR. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *J Invest Dermatol*. 1998;111(2):233–8.
36. Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol*. 1998;139(3):444–52.
37. Costin G-E, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007;21(4):976–94.
38. Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res*. 2004;17(2):96–110.
39. Hernández-Barrera R, Torres-Alvarez B, Castaneda-Cazares JP, Oros-Ovalle C, Moncada B. Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol*. 2008;33(3):305–8.
40. Tomita Y, Maeda K, Tagami H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res*. 1992;5(5 Pt 2):357–61.
41. Jo H-Y, Kim C-K, Suh I-B, Ryu S-W, Ha K-S, Kwon Y-G, et al. Co-localization of inducible nitric oxide synthase and phosphorylated Akt in the lesional skins of patients with melasma. *J Dermatol*. 2009;36(1):10–6.

42. Hart PH, Grimaldeston MA, Swift GJ, Jaksic A, Noonan FP, Finlay-Jones JJ. Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med.* 1998;187(12):2045–53.
43. Kim N-H, Lee A-Y. Histamine effect on melanocyte proliferation and vitiliginous keratinocyte survival. *Exp Dermatol.* 2010;19(12):1073–9.
44. Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;114(2):334–42.
45. Lavker RM, Kligman AM. Chronic Heliodermatitis: A morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol.* 1988;90(3):325–30.
46. Fajardo I, Pejler G. Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase. *J Immunol.* 2003;171(3):1493–9.
47. Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H, et al. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1657–62.
48. Iddamaloda A, Le QT, Ito K, Tanaka K, Kojima H, Kido H. Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. *Arch Dermatol Res.* 2008;300 (Supl 1):69-76.
49. Krämer M, Sachsenmaier C, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. UV irradiation-induced interleukin-1 and basic fibroblast growth factor synthesis and release mediate part of the UV response. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6734–41.
50. Strickland I, Rhodes LE, Flanagan BF, Friedmann PS. TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression. *J Invest Dermatol.* 1997;108(5):763–8.
51. Kim EJ, Park H-Y, Yaar M, Gilchrist BA. Modulation of vascular endothelial growth factor receptors in melanocytes. *Exp Dermatol.* 2005;14(8):625–33.
52. Regazzetti C, De Donatis GM, Ghorbel HH, Cardot-Leccia N, Ambrosetti D, Bahadoran P, et al. Endothelial cells promote pigmentation through endothelin receptor B activation. *J Invest Dermatol.* 2015;135(12):3096–104.
53. Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Yamamoto N, Mizutani H, et al. Wnt/ β -Catenin and Kit signaling sequentially regulate melanocyte stem cell differentiation in UVB-induced epidermal pigmentation. *J Invest Dermatol.* 2013;133(12):2753–62.
54. Mylona E, Vamvakaris I, Giannopoulou I, Theohari I, Papadimitriou C, Keramopoulos A, et al. An immunohistochemical evaluation of the proteins Wnt1 and glycogen synthase kinase (GSK)- β in invasive breast carcinomas. *Histopathology.* 2013;62(6):899–907.
55. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 2009;19(3):119–29.
56. Kato M. Expression and regulation of WNT1 in human cancer: up-regulation of WNT1 by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Oncol.* 2003;22(1):209–12.
57. Tamega A de A, Miot HA, Moço NP, Silva MG, Marques MEA, Miot LDB. Gene and protein expression of oestrogen- β and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosmet Sci.* 2015;37(2):222–8.
58. Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt Signaling and Injury Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 ;4(8): a008078.
59. Yamaguchi T, Nishijima M, Tashiro K, Kawabata K. Wnt- β -Catenin signaling promotes the maturation of mast cells. *BioMed Res Int.* 2016; 2016: 2048987.
60. Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lynn Lamoreux M, et al. Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(5):623–34.
61. Millar SE, Miller MW, Stevens ME, Barsh GS. Expression and transgenic studies of the mouse agouti gene provide insight into the mechanisms by which mammalian coat color patterns are generated. *Dev Camb Engl.* 1995;121(10):3223–32.
62. Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD, Barsh GS. Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 1998;12(3):316–30.
63. Fortino V, Maioli E, Torricelli C, Davis P, Valacchi G. Cutaneous MMPs are differently modulated by environmental stressors in old and young mice. *Toxicol Lett.* 2007;173(2):73–9.
64. Amano S. Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009;14(1):2–7.
65. Pittayapruek P, Meehansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016 17(6): 868.
66. Bastonini E, Kovacs D, Picardo M. Skin pigmentation and pigmentary disorders: focus on epidermal/dermal cross-talk. *Ann Dermatol.* 2016;28(3):279–89.
67. Yamamoto O, Bhawan J, Solares G, Tsay AW, Gilchrist BA. Ultrastructural effects of topical tretinoin on dermo-epidermal junction and papillary dermis in photodamaged skin. A controlled study. *Exp Dermatol.* 1995;4(3):146–54.

Conclusões

1. A pele com melasma, em comparação com a pele sã adjacente e pele retroauricular, apresenta:
 - maior compactação da camada córnea;
 - maior pigmentação melânica epidérmica;
 - maior número de falhas da integridade da zmb e melanócitos em pêndulo;
 - elastose solar mais proeminente;
 - maior heterogeneidade do colágeno na derme papilar, entretanto sem diferença quando à densidade do colágeno;
 - maior densidade de material elastótico na derme superior;
 - maior celularidade na derme superior;
 - maior número de mastócitos e estruturas vasculares na derme superior.

O que indica aumento da melanogênese, alterações na barreira epidérmica, dano à derme superior e zona da membrana basal.
2. A pele com melasma apresenta, à imunofluorescência direta, maior intensidade de marcação citoplasmática para a proteína Wnt1 do que a pele sã adjacente, além de maior marcação na pele retroauricular também em comparação com a pele sã adjacente. Não houve diferença quanto à marcação de WIF-1 e ASIP entre as topografias.
3. À MET, a pele com melasma apresenta, em relação à pele adjacente sã e retroauricular, maior quantidade de danos à ZMB, maior número de organelas citoplasmáticas e melanossomas maduros.
4. As variáveis que mais se correlacionaram com as topografias faciais foram a elastose solar, heterogeneidade do colágeno, celularidade da derme, contagem de mastócitos, melanócitos em pêndulo, número de estruturas vasculares, alterações nas fibras elásticas e imunoexpressão de Wnt1. A associação preferencial com melasma ocorreu com a contagem de mastócitos, celularidade na derme superficial e alterações do material elastótico.

Perspectivas

O melasma parece configurar um fenótipo individualizado - e não somente uma extensão do fotoenvelhecimento ou do envelhecimento intrínseco - e suas vias melanogênicas diferem daquelas que ocorrem nas efélides e no bronzeamento. Este estudo integrou os achados morfológicos que são relevantes no melasma e salientou a atividade da via Wnt na sua patogênese.

A celularidade dérmica - presença de fibroblastos, histiócitos e *stem cell* - precisa ser explorada comparativamente nas três topografias de interesse, já que permitiria caracterizar o padrão de organização e do tipo de reparo que ocorre na derme superior do melasma.

A via Wnt possui múltiplos ativadores que deflagram diferentes respostas, desde a embriogênese, oncogênese e até reparo. A escolha pelo Wnt1 em nosso estudo foi uma forma de confluir a avaliação de diferentes *triggers*. Tal via precisa ser minuciosamente investigada no melasma – tanto através de metodologia molecular quanto proteômica, com destaque para a participação do Wnt3, Wnt5a, Wnt7 e ativadores da via canônica do Wnt.

A realização de ensaios clínicos em busca de inibidores da via Wnt ou de mecanismos que recuperem a derme superior e estimulem o reparo tecidual – como microagulhamento – são possibilidades promissoras no melasma.

A secreção epidérmica de plasmina também participa do dano à ZMB e o papel do ácido tranexâmico como forma de reduzir sua produção - e consequente lesão - precisa ser melhor estudado.

A atividade das metaloproteinases é dependente do pH e do tônus oxidativo. Uso de antioxidantes que diminuam a síntese de iNOS (óxido nítrico sintetase induzida), como a nicotinamida, podem ser também opções de tratamento.

Finalmente, estudos de base fisiopatológica aumentam a compreensão do melasma e permitirão a idealização de tratamentos eficientes e duradouros para esta doença, responsável por grande sofrimento psíquico e queda importante dos níveis de qualidade de vida dos pacientes.

Anexos

Anexo 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de Wnt, WIF1 e ASIP no melasma, pele perilesional e área fotoprottegida

Pesquisador: Ana Cláudia Cavalcante Espósito

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 54374916.7.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

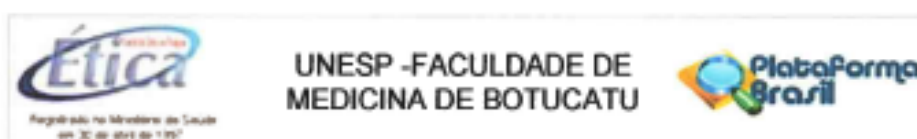
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.602.185

Apresentação do Projeto:

O melasma é hipermelanose adquirida, caracterizada por máculas de limites irregulares, simétricas, com distribuição preferencial por áreas fotoexpostas. O sexo feminino é o mais acometido (apenas 10% dos pacientes com melasma são homens). São fatores de risco para melasma: exposição solar, história familiar, contraceptivo oral, gestação, terapia hormonal. Tem grande impacto na aparência, gerando sofrimento emocional, psicossocial e reduzindo o índice de qualidade de vida dos pacientes. O melasma parece resultar, em maior instância, da interação entre fatores hormonais e radiação ultravioleta. Apesar da ampla gama de estudos já realizados, ainda não compreendemos de forma satisfatória as vias que influenciam a melanogênese. Uma destas vias envolve o Wnt, que atua na diferenciação das células da crista neural em células pigmentadas, e seu antagonista extracelular WIF1 (fator inibidor de Wnt). Outra via de interação é através do gene AGOUTI, que codifica a proteína ASIP. Esta proteína age como antagonista competitivo do receptor de melanocortina 1, bloqueando sua ativação pelo hormônio estimulador de melanócitos. Mais estudos são necessários para elucidar como o WIF1 atua na sinalização do Wnt, como outras vias interagem com esta sinalização, qual seu real papel no melasma, bem como o papel do ASIP no melasma.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capefup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.632.165

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofinal3.pdf	13/06/2016 19:12:40	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	13/06/2016 19:12:07	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Outros	pendenciasCEP.doc	13/05/2016 17:13:17	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.doc	13/05/2016 17:10:24	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Outros	documentoarematematica.pdf	13/05/2016 16:55:02	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Orçamento	orcamento.doc	19/03/2016 19:55:46	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	19/03/2016 19:55:00	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Outros	eticabotucatu.pdf	24/02/2016 18:19:12	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	24/02/2016 18:11:16	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 22 de Junho de 2016

Assinado por:

SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-070
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3300-1508 E-mail: cap@fup@fmb.unesp.br

Página 05 de 05

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

Você foi convidada a participar de um projeto de pesquisa chamado “Expressão de Wnt, WIF1 e ASIP no melasma, pele perilesional e área fotoprotegida”, que pretende estudar se as proteínas Wnt, WIF1 e AGOUTI podem estar relacionada ao desenvolvimento de determinado tipo de mancha na face denominada melasma. A senhora foi selecionada a participar dessa pesquisa por ter este tipo de mancha.

A pesquisa constará da realização de três biópsias, que é a retirada de uma pequena porção circular de pele de 3 mm de diâmetro após anestesia local por meio de uma lâmina médica, em área mais lateral da face (para não comprometer a estética). Será um fragmento da pele com mancha, um da pele sem mancha próxima da mesma e um atrás da orelha. Todo o procedimento não deve demorar mais de 10 minutos para ser concluído. Nos três locais da biópsia será dado ponto com um fio bastante fino (para não comprometer a estética) e este poderá ser retirado em 7 dias. São complicações possíveis do procedimento: dor, infecção local. Este material será totalmente utilizado até o fim do Projeto. Assim, não restará nenhuma parte do material coletado no fim da Pesquisa. Durante o desenvolvimento do Projeto, as amostras ficarão armazenadas no Laboratório TOXICAM (Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena), do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP – campus de Botucatu), sendo o telefone de contato: (14) 3880-1590.

O conhecimento das características dos fragmentos de pele que serão estudadas permitirá que sejam elaboradas novas hipóteses sobre as causas e fatores desencadeantes do melasma. Este projeto não está relacionado a nenhum tratamento comercial do melasma.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento ou preferência de agendamento médico. Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo. É garantido total sigilo do seu nome em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos. Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

Se desejar conhecer o resultado da pesquisa, ou o seu resultado em específico, deve entrar em contato com os pesquisadores, pelo telefone abaixo.

Uma via desse termo de consentimento deve ser guardada com o sujeito da pesquisa, e outra será arquivada junto ao pesquisador.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome do paciente: _____ Assinatura: _____

Ana Cláudia Cavalcante Espósito

Data: ___/___/___ Assinatura: _____

Orientador: Hélio Amante Miot, Rua Magnólia, 400, Botucatu. Fone: (14) 3882-4922. E-mail: heliomiot@fmb.unesp.br; Pesquisadora: Ana Cláudia Cavalcante Espósito, Rua Ranimiro Lotufo, 593, Botucatu. Fone: (14) 3815-2943. E-mail: anaclaudiaesposito@gmail.com

Anexo 3: Análise quantitativa de imagem e avaliações qualitativas

Avaliação da espessura do estrato córneo, espessura da epiderme total:

Abrir arquivo da coloração Hematoxilina-Eosina / Marcar dois pontos (sendo um em cada extremidade) do local de interesse de medir a espessura / Medir / utilizar as coordenadas X e Y dos dois pontos para calcular a distância euclidiana entre eles:

$$d = \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2}$$

Compactação da camada córnea:

Escala visual qualitativa sendo 0: ausência de compactação (córnea em “rede de basquete”); 1: compactação parcial da camada córnea, intercalando áreas sem e com compactação; 2: córnea difusamente compacta;

Elastose solar:

Escala visual qualitativa, sendo 0: ausência de elastose solar; 1: elastose solar leve a moderada na derme superior, avaliada pele basofilia ; 2: elastose solar moderada a intensa, com basofilia relevante na derme superior;

Celularidade na derme superior:

Contagem (visual) do número de células por campo, localizadas na derme superior em aumento de 40x;

Fontana-Masson – densidade de melanina na epiderme e na derme:

Abrir arquivo / canais RGB / escolher o azul / binarizar / selecionar área de interesse (epiderme ou derme superficial) / medir

Falhas na ZMB por campo:

Contagem, à coloração de PAS, do número de falhas e interrupções na integridade da ZMB por campo, a um aumento de 40x;

Melanócitos em pêndulo:

Contagem, à coloração de PAS, do número de células por campo (aumento de 40x) da epiderme que se projetavam em direção à derme e que apresentavam morfologia de melanócito;

Densidade do material elastótico na derme superior (coloração Verhoeff): utilizado Macro

```
macro "Prepara [1]" {
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4 equalize");
run("Split Channels");
selectImage(3);
run("Close");
selectImage(2);
run("Close");
//setTool("rectangle");
}
```

```
macro "Porcentual Verhoeff [2]" {
run("Crop");
run("Make Binary");
```

```
run("Restore Selection");  
run("Set Measurements...", " area_fraction display redirect=None decimal=2");  
run("Measure");  
run("Close");  
}
```

Avaliação da densidade do colágeno (coloração Picrosirius red):

Abrir arquivo / aumentar contraste / canais RGB / escolher o azul / selecionar derme superior / recortar / binarizar / inverter / retornar seleção / medir

Para a dimensão fractal do colágeno (coloração Picrosirius red):

Abrir arquivo / aumentar contraste / canais RGB / escolher o azul / binarizar / inverter / selecionar derme de superior / recortar / esqueletonizar / avaliar dimensão fractal.

Contagem de mastócitos por campo:

Contagem do número de mastócitos por campo (aumento de 40x) corados por azul de toluidina e localizados na derme superior. Os mastócitos são ovalados, com núcleo central e citoplasma granular (presença de heparina nos grânulos possibilita a marcação por azul de toluidina, sendo visualizada cor avermelhada).

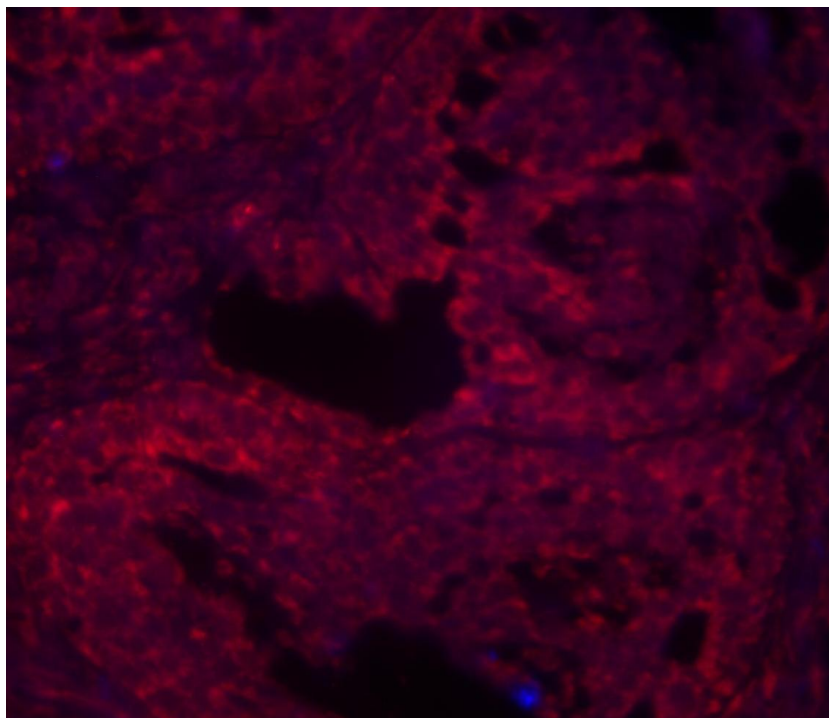
Estruturas vasculares à imuno-histoquímica por CD34:

Contagem do número de estruturas vasculares por campo (aumento de 40x) localizados na derme superior. CD34 é um bom marcador de células endoteliais e permite contagem do número de estruturas vasculares.

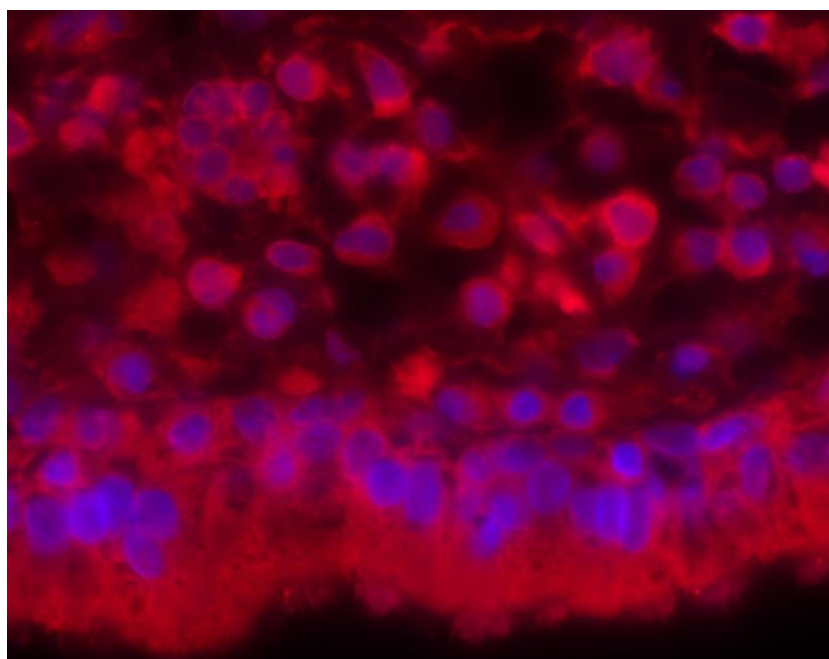
Quantificação da marcação para Wnt1, WIF-1 e ASIP através do ImageJ 1.51e:

Abrir o arquivo de interesse / canais RGB / selecionar canal vermelho / selecionar canal vermelho / medir;

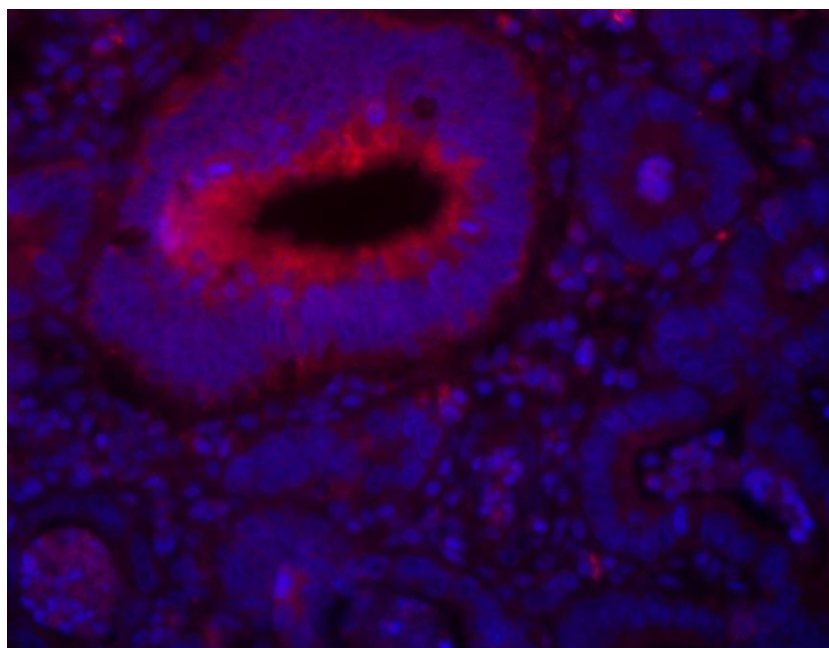
Anexo 4: Controles positivos das IFD



Anexo 4.1 – Controle positivo do anticorpo anti-Wnt (câncer de mama).



Anexo 4.2 – Controle positivo do anticorpo anti-WIF-1 (traqueia de rato).



Anexo 4.3 – Controle positivo do anticorpo anti-ASIP (carcinoma de cólon).