



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

Luiza Vasconcelos Schaefer

**ESTUDO PROTEÔMICO DO MELASMA
FACIAL EM MULHERES**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu

2018

Luiza Vasconcelos Schaefer

**ESTUDO PROTEÔMICO DO MELASMA
FACIAL EM MULHERES**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu

2018

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

Schaefer, Luiza Vasconcelos.

Estudo proteômico do melasma facial em mulheres / Luiza Vasconcelos Schaefer. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Hélio Amante Miot

Capes: 40101029

1. Mulheres - Doenças. 2. Face - Doenças. 3. Distúrbios de pigmentação da pele. 4. Melanose. 5. Proteômica. 6. Estudos transversais.

Palavras-chave: Melanose; Melasma; Proteômica; Proteínas; Transtornos da pigmentação.

Trabalho realizado no ambulatório do Departamento de Dermatologia do Hospital Regional de Presidente Prudente / UNOESTE, no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da Unesp (CEVAP) e no Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina da Universidade Júlio de Mesquita Filho-FMB-Unesp.

Sumário

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	6
ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	7
RESUMO.....	5
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
MELASMA.....	6
MELANOGÊNESE NO MELASMA.....	14
PROTEÔMICA CLÍNICA	24
2. OBJETIVOS	37
3. ARTIGO CIENTÍFICO	38
4. CONCLUSÕES	59
5. PERSPECTIVAS	60
6. APÊNDICES.....	62
7. ANEXOS	71

Dedicatória

A minha filha Cecília, que participou ainda intra-útero e, posteriormente nos seus primeiros meses de vida, de todo o processo do último ano da pós graduação e, com seu sorriso mágico, me mostrou todos os dias que eu podia continuar em frente.

Ao meu marido Arnaldo, que com amor e cuidado, me apoiou em todas as minhas escolhas e decisões e, mais do que qualquer outro alguém, acreditou no sucesso do meu projeto.

Ao meu pai Sérgio, de quem herdei o amor pela carreira acadêmica e que me ensinou que a ciência é o caminho para a realização profissional.

A minha mãe Olivia, que com seu amor incondicional, me deu o colo que precisei e assim me manteve confiante no meu propósito de ser mãe, dermatologista e pesquisadora ao mesmo tempo.

A minha irmã Livia, que é meu exemplo de força e que me inspira todo dia a acordar, olhar adiante e acreditar nas coisas boas que o dia pode trazer.

Aos meus queridos e eternos mestres da Dermatologia - Unesp, que me ensinaram a ser dermatologista e, mais do que isso, me ensinaram a amar a minha profissão me mostrando o quão bela e importante ela é.

Agradecimento Especial

A Deus,

Por cuidar de mim, por me proteger em todas as viagens até Botucatu, por me proporcionar lucidez para trabalhar, estudar, viajar e cuidar da minha família.

Ao meu orientador Hélio Amante Miot,

Por ser uma inspiração para mim, como dermatologista e pesquisador. Por conseguir, com sua sapiência, me conduzir nos tortuosos caminhos da pesquisa e me mostrar que o destino final sempre compensa a trajetória. Agradeço imensamente pela paciência em me orientar, na maior parte do tempo, a distância.

Agradecimento

Às pacientes, por contribuírem com a pesquisa, por acreditarem nos frutos que viriam dela e de uma forma altruísta cederem seu tempo e amostras da sua pele.

À Dra. Lucilene Delazari dos Santos, Nayara Rodrigues Vieira Cavassan e Leticia Gomes de Pontes, por terem participado ativamente do projeto, auxiliando em todos os processos que envolvem a proteômica, desde a preparação das amostras até a obtenção dos resultados. Sem vocês o projeto não poderia ter sido concretizado.

À funcionária Vânia Soler, por me ajudar inúmeras vezes, por tornar menor a distância entre mim e as burocracias inerentes à pós graduação.

Ao Fundo de apoio à Dermatologia de São Paulo - Sebastião Sampaio (FUNADERSP), pelo fomento à pesquisa e por entender que este estudo contribuiria para a dermatologia.

À banca da qualificação, dra Maria Regina C. Silvares e dr. Juliano Schimitt, pelo tempo despendido na leitura e participação da banca, além das oportunas considerações para o texto.

À dra Luciane Miot, por me acolher em sua casa durante as reuniões, às vezes tarde da noite, sempre com um sorriso no rosto e com uma delicadeza incomparável.

À Dra Luciana Abbade, por emprestar sua casa enquanto estava fora do país e transformá-la na "hospedaria" oficial de seus ex-residentes durante as disciplinas em Botucatu.

Aos residentes do Hospital Regional de Presidente Prudente, por me ajudarem a captar pacientes, a coletar os dados epidemiológicos e as amostras cutâneas. Sem este auxílio, todo este processo seria mais longo e difícil.

Aos colegas dermatologistas professores da Unoeste e médicos do Hospital Regional, por me cobrirem quando precisei me ausentar para as aulas da pós graduação, pelo auxílio na captação de pacientes e pela torcida para que meu projeto fosse bem sucedido.

Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

°C - Graus Celsius	MASI - <i>Melasma Area and Severity Index</i>
2D - Eletroforese bidimensional	MC1-R - Receptor de melanocortina 1
2D-SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida	MDA - Malondialdeído
α MSH - Hormônio estimulador de melanócito alfa	MELASQoL - <i>Melasma Quality of Life Scale</i>
ACN - Acetonitrila	MET - Microscopia eletrônica de transmissão
ACTG1 - Actina gama-1	Microl - Microlitros
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico	Min - Minutos
ATP - Adenosina trifosfato	ml - Mililitros
ASIP - <i>Agouti signaling protein</i>	mM - Milimolar
C-Kit - Receptor de tirosina quinase	mMASI - MASI modificado
CEVAP - Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da Unesp	MMP - Metaloproteinase
CHAPS - (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate).	MS - Espectrometria de massas
CHO - Contraceptivo hormonal oral	MSH - Hormônio estimulador de Melanócitos
Correceptor-Lrp - Proteína relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade	MudPIT - <i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
COX-2 - Ciclooxygenase 2	M/P - melasma/ perilesional
DIF - Imunofluorescência direta	NaCl - Cloreto de sódio
DLQI - <i>Dermatology Life Quality Index</i>	NGF - Fator de crescimento neural
DNA - Ácido desoxirribonucleico	nm - Nanômetro
DTT - Ditioneitol	NO - Óxido nítrico
EM- Espectrometria de massas	PAS - Ácido periódico de Schiff
ESI - Electrospray ionization	PCR - Reação em cadeia de polimerase
ET-1 - Endotelina 1	PDL - <i>Pulsed Dye Laser</i>
EUA - Estados Unidos da América	PDZK1 - PDZ proteína de domínio renal 1
FDR - <i>False Discovery Rate</i>	pH - Potencial hidrogeniônico
FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu	PLGS - <i>ProteinLynx Global Server</i>
Fzd - Receptor Frizzled	POMC - Proopiomelanocortina
g - Gramos	PPAR - Receptor alfa do ativador da proliferação de peroxissomo
G - Gravidade	QS-Nd:YAG - <i>Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet</i>
GSH - Glutathione	RNA _m - RNA mensageiro
GSK-3 - <i>Glicogen sintase kinase-3</i>	RUV - Radiação ultravioleta
h - Horas	SFC - Fator estimulador de células tronco
HBD- Hemoglobina delta	TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
HGF- Fator de crescimento hepatocítico	TNF - Fator de Necrose Tumoral
HPLC-RP- Cromatografia líquida de fase reversa	TRP-1 - Proteína relacionada à tirosinase 1
IAA - Iodocetamida	TSH - Hormônio tireoestimulante
IC 95% - Intervalo de confiança de 95%	TYR - Tirosinase
IFD - imunofluorescência direta	TYRP1 e 2 - Proteínas 1 e 2 relacionadas à tirosinase
iNOS - Óxido nítrico sintetase induzida	UNESP- Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
iTRAQ - <i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>	v/v - volume/ volume
JNK - N-terminal c-Jun	VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular
LC/MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	WIF-1 - Fator 1 inibidor de Wnt
LIP - Luz intensa pulsada	Wnt/ β catenina - Via canônica do Wnt
m/v - massa/ volume	XIC - <i>Extracted Ion Chromatogram</i>
MALDI - <i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>	ZMB - Zona de membrana basal

Resumo

Fundamentos: Melasma é uma alteração da pigmentação melânica da pele, adquirida, comum, caracterizada por máculas em geral simétricas, hiperpigmentadas, com margens irregulares e de limites definidos. Embora tenha alta frequência populacional não se conhece completamente a sua fisiopatologia e os estímulos envolvidos na hipertrofia melanocítica e hipermelanogênese focal.^[1] A proteômica estuda o conjunto de proteínas e suas isoformas contidas em uma amostra biológica, seja esta uma organela celular, uma célula, um tecido ou um organismo propriamente dito. O uso de ferramentas proteômicas propostas neste trabalho auxiliarão na prospeção da rede de proteínas diferencialmente expressas na pele com melasma e sã, adjacente, substanciando a elaboração de hipóteses fisiopatológicas para a doença.

Objetivo: Identificação diferencial de proteínas expressas na pele com melasma facial e na pele sã adjacente.

Métodos: Estudo transversal, envolvendo 20 mulheres, maiores de 18 anos, com melasma facial, sem tratamento específico há mais 30 dias, exceto protetor solar. Foram realizadas duas biópsias com *punch* 3 mm na face de cada paciente, sendo uma em região com melasma e outra em pele sã adjacente (40 fragmentos). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas, digeridas em tripsina, e, as proteínas extraídas, submetidas à espectrometria de massas. A dimensão do efeito foi estimada pela razão de abundância entre as proteínas identificadas nas topografias (melasma/ perilesional).

Resultados: A idade média (desvio-padrão) das pacientes foi de 42,8 (8,9) anos, 45% eram do fototipo IV e 25% exerciam profissões expostas ao sol. A idade de início do melasma foi 29,3 (7,5) anos, 55% das mulheres referiam histórico familiar e 30% usavam anticoncepcional. Foram identificadas 256 proteínas nas amostras. Houve expressão significativamente diferencial entre as topografias para 29 proteínas (25 super-reguladas e 4 sub-reguladas). ACTG1, ALB, SERPINA1, HBD, ALDOA e FGG mostraram participar, simultaneamente, de diferentes processos biológicos identificados. Fenômenos de transporte celular, reparo tecidual, coagulação e resposta ao estresse, partilham de padrões de abundância semelhantes entre as proteínas identificadas.

Conclusões: Em comparação com a pele adjacente, no melasma foram identificadas proteínas, diferencialmente expressas, que participam de funções biológicas ligadas à glicólise, gliconeogênese, fenômenos de transporte celular, homeostasia, coagulação, reparo / cicatrização e resposta a estímulos externos.

Palavras-chave: Melasma, proteômica, melanose, proteínas, luz solar, raios ultra-violetas, melanócitos, pigmentação da pele, transtornos da pigmentação.

1. REVISÃO DA LITERATURA

Melasma

Melasma é uma alteração da pigmentação melânica da pele, adquirida, comum, caracterizada por máculas em geral simétricas, hiperpigmentadas, com margens irregulares e de limites definidos (Figura 1), que ocorre em áreas fotoexpostas. Sua principal localização é na face, seguido pelo colo e antebraços. Acomete principalmente mulheres jovens até a meia idade, durante o menacme, com fototipos mais altos (III a V), principalmente, de ascendência hispânica, asiática, africana ou do Oriente Médio (Handel, 2014).



Figura 1. Melasma facial. Hiper melanização localizada nas regiões zigomáticas, bucais, labial superior, frontal e superciliar em mulher adulta (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Apesar de assintomático, pela alta prevalência populacional, pelo acometimento de áreas visíveis – como a face, especialmente de mulheres em idade fértil com fototipos mais escuros (III-V) e pela refratariedade ao tratamento, constata-se importante impacto à qualidade de vida (QV) pelo melasma (Freitag, 2008; Maranzato, 2016).

No Brasil, as alterações pigmentares representam o terceiro maior grupo de doenças nos consultórios dermatológicos, em torno de 8,4% das queixas em consultas, de acordo com estudo conduzido pela Sociedade Brasileira de Dermatologia, em 2005 (SBD, 2006). Não há dados populacionais do melasma, no Brasil, porém, em estudo conduzido em 515 adultos no interior do Estado de São Paulo, melasma foi identificado em 6 % de homens e 34% das mulheres trabalhadores de uma instituição pública (Ishyi, 2014).

O principal fator de risco associado ao melasma é a exposição solar crônica, porém, outros fatores como gravidez, uso de anticoncepcional oral, uso de alguns cosméticos, estresse emocional, disfunção tireoidiana e outras alterações hormonais também são descritos (Handel, 2014).

A classificação clínica do melasma se baseia nas áreas de acometimento, sendo os principais tipos: centofacial e periférico. O tipo centofacial engloba as áreas frontal, nasal, malar, labial superior e inferior e mentoniana. Já o tipo periférico compreende as regiões temporais, preauriculares e ângulo da mandíbula. Formas mistas são identificadas em 43% dos pacientes (Tamega, 2012). Existem ainda outras denominações como melasma malar ou melasma mentoniano (acometimento isolado destas regiões) (Tamega, 2013). A designação melasma extrafacial é utilizada para todas as outras áreas do corpo afetadas que não a face, como por exemplo, membros superiores, região cervical (Figura 2) ou ainda o tronco.

O diagnóstico do melasma é fundamentalmente clínico. Existem técnicas que podem auxiliar na avaliação do melasma, como a lâmpada de Wood (Figura 3), que é uma lâmpada de mercúrio com vidro de silicato de Bário e 9% de Óxido de Níquel, permitindo somente a passagem de radiações ultravioletas de 340-450nm (Tamlar, 2009).



Figura 2. Melasma extrafacial. Hiperpigmentação melânica no tórax anterior (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

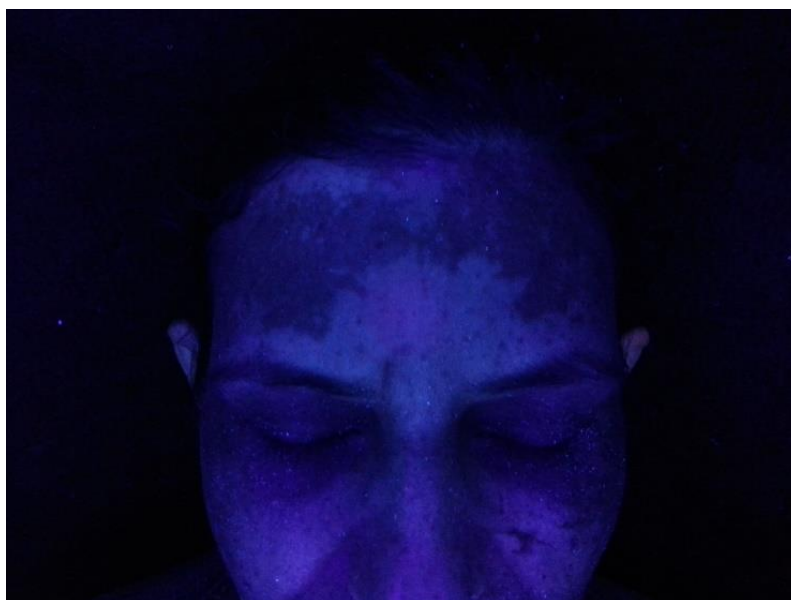


Figura 3. Melasma facial visualizado à lâmpada de Wood. Marcada pigmentação frontal e zigomática (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Outra técnica que pode auxiliar no diagnóstico, é a dermatoscopia, no qual a tonalidade da melanina sugere a densidade do pigmento (Figura 4). A dermatoscopia ainda pode auxiliar na visualização do componente vascular, muitas vezes presente no melasma (Tamlar, 2009).



Figura 4. Dermatoscopia do melasma. Limite da lesão pigmentar (à esquerda) com a pele normal. A rede pigmentar acastanhada e as telangiectasias encontram-se mais evidentes na pele com melasma. (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Histologicamente, o melasma se caracteriza por hiperpigmentação epidérmica, sem aumento do número de melanócitos, que se apresentam hipertrofiados e com maior número de dendritos, o que caracteriza sua hiperfunção. Há aumento de melanina em todas as camadas da epiderme (Figura 5), aumento do número de melanossomas maduros, inflamação e elastose dérmica. A pigmentação dérmica não difere na pele com melasma e na pele sã adjacente (Miot, 2007).

Na derme do melasma, há aumento da celularidade (fibroblastos), proliferação endotelial e maior degradação elastótica do colágeno, sugerindo que ocorra dano inflamatório e atividade de proteases subjacentes (Figura 6).

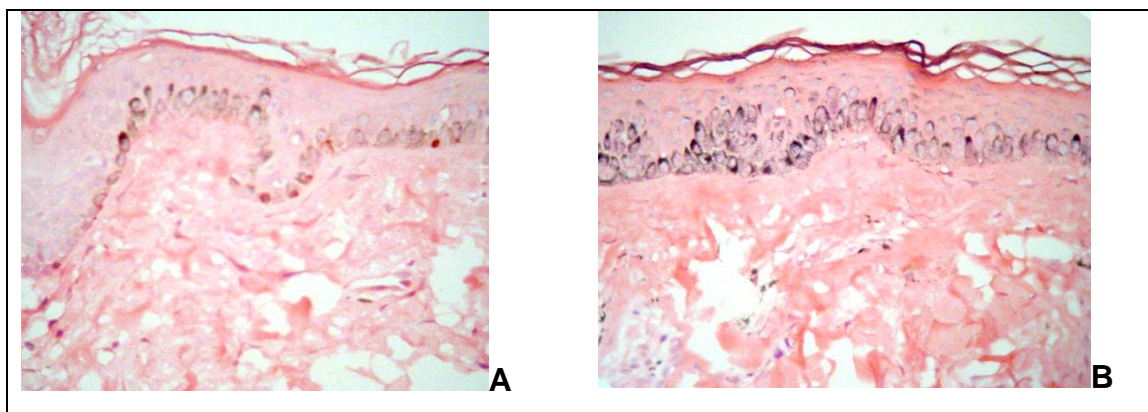


Figura 5. Exame histopatológico da pele normal adjacente (A) e melasma (B). Maior expressão de melanina em toda a epiderme do melasma. Fontana-Masson (40x) (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

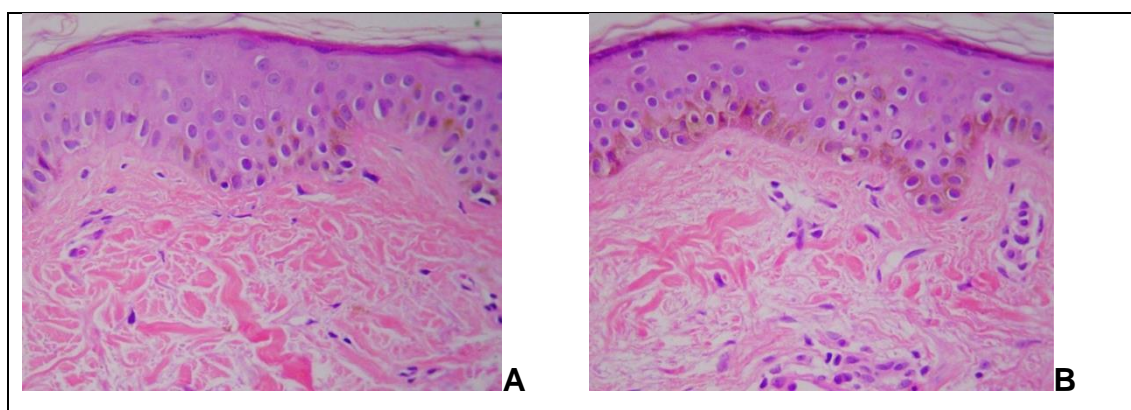


Figura 6. Celularidade aumentada na derme da pele sã adjacente (A) e derme do melasma (B). Observa-se a desorganização do colágeno na derme papilar do melasma. HE (40x) (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

A zona de membrana basal do melasma, apresenta irregularidades e descontinuidades na sua estrutura. Ademais, ocorrem projeções dos melanócitos na derme (melanócitos em pêndulo), o que pode favorecer o contato dos melanócitos com estímulos oriundos dos fibroblastos e células inflamatórias (Figura 7).

Melanócitos em pêndulo são encontrados em diferentes tecidos e, provavelmente, indiquem um processo de autofagia. Pode ser induzido por UVA e estímulos oxidativos que levem ao dano de organelas (Bacharach-Buhles, 1999; Setaluri, 2015). Tendo em vista que o estímulo hormonal e de radiação ultravioleta ocorra de forma semelhante em peles adjacentes, gerando fenótipos pigmentares distintos, a maior proporção de melanócitos em pêndulo pode indicar maior processo de autofagia na pele com melasma.

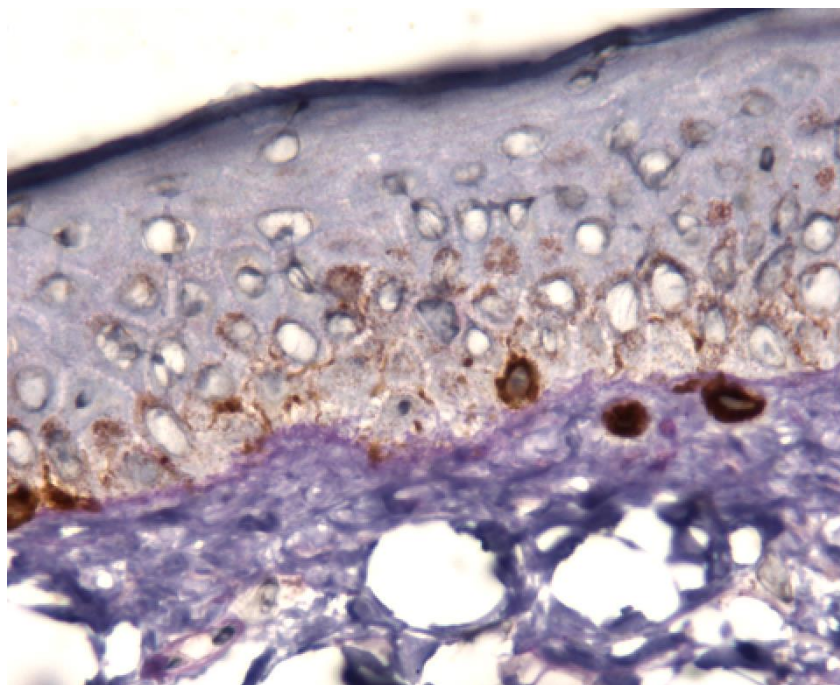


Figura 7. Melanócitos em pêndulo, além de descontinuidade da membrana basal, imunomarcção pelo Melan-A e contracoloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Em estudo recente de nosso grupo (ainda não publicado), 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 (Davis, 2010) (Figura 8).

Esses aspectos podem levar à hipótese que melasma resulte de alterações cutâneas dispostas em mosaico na pele, oriundas da miscigenação populacional, principalmente, porque a doença ocorre em grupos de pigmentação intermediários (>90% fototipos III-V) e ocorre associação entre a incidência de melasma e ancestralidade genômica africana (Dale, 1996; D'Elia, 2017).

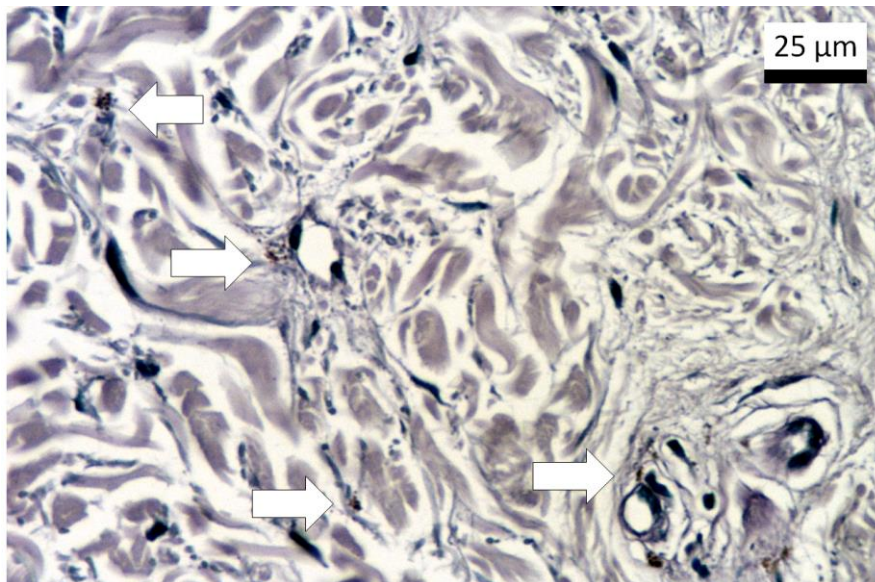


Figura 8. Mastócitos na derme superficial (setas) da pele com melasma, dispostos preferencialmente em topografia perivascular, com grânulos metacrômicos (púrpura) à coloração de azul de toluidina (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Ultraestruturalmente, os melanócitos da pele com melasma produzem e transferem um número aumentado de melanossomas se comparados aos melanócitos de pele normal adjacente. Além disso, a mitocôndria, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso estão aumentados em número. Esses achados dão suporte à teoria dos melanócitos hiperfuncionais, presumivelmente estimulados pela radiação UV, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento oriundos da derme e hormônios. (Chang, 2010; Miot, 2009; Tamega, 2013) (Figura 9).

Há evidências que ocorra também dano à lâmina densa, rica em colágeno tipo IV (dados não publicados).

Apesar da frequência populacional, e da monotonia da expressão clínica, derivada unicamente da hiperatividade da unidade epidermo-melânica, não se conhece totalmente a fisiopatologia do melasma e os processos que induzem a hiperfunção melanocítica.

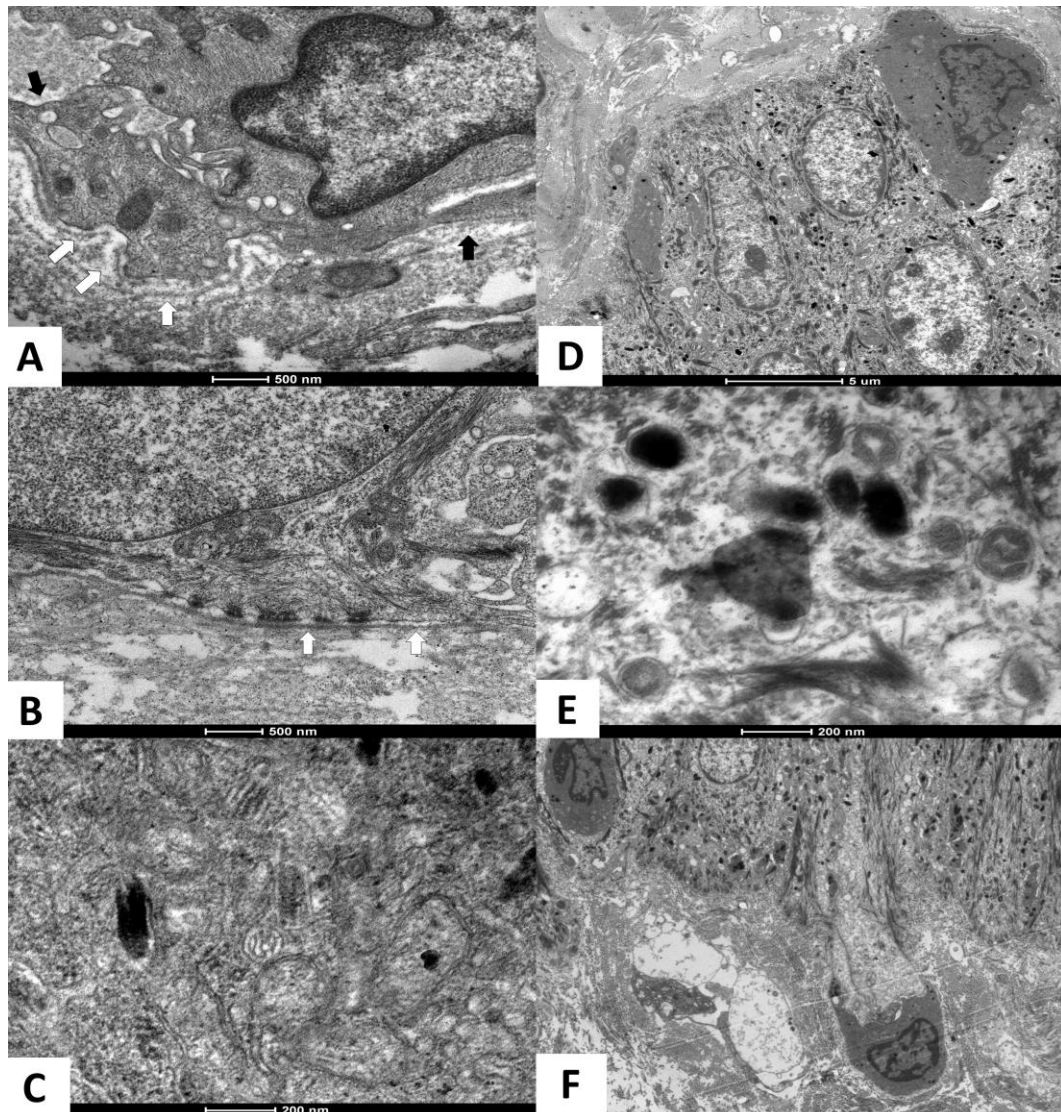


Figura 9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) na pele com melasma. Setas claras nas figuras A e B indicando os locais de fragmentação da lâmina densa e setas escuras mostram completa desestruturação. A figura C evidencia a densidade aumentada de organelas citoplasmáticas nos queratinócitos (mitocôndrias e retículo endoplasmático). Na pele com melasma, há grande quantidade de melanossomas maduros (III e IV) nos queratinócitos (D e E). Na imagem F é possível visualizar a projeção de um melanócito em direção à derme (melanócito em pêndulo). (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Melanogênese no melasma

A cor da pele humana é influenciada diretamente pela produção da melanina. Os carotenoides, que são pigmentos exógenos amarelos e a hemoglobina com os tons de vermelho e azul (através dos capilares e vênulas) também contribuem para a tonalidade da pele (Miot, 2009).

A produção de melanina ocorre dentro dos melanócitos que estão localizados principalmente na camada basal da epiderme. Existem em torno de dois mil ou mais melanócitos epidérmicos por milímetro quadrado de pele da cabeça e antebraço e cerca de mil no restante do corpo. Na pele, a diferença racial da tonalidade não se dá pelo número de melanócitos presentes, mas sim pelo grau de atividade do melanócito (síntese de melanina e melanossomas), pela proporção dos subtipos de melanina (eumelanina: marrom-preta e feomelanina: amarela-vermelha) e pelos fatores ambientais (estímulo na síntese de melanina) (Videira, 2013).

Na melanogênese existem diversos mecanismos que ocorrem no melanossoma responsáveis pela pigmentação cutânea. Na síntese da melanina, a tirosina sofre atuação da tirosinase e se transforma em L-Dopa e, posteriormente, em Dopaquinona (Figura 10). Deste ponto em diante, se houver incorporação da glutatona ou cisteína, a dopaquinona forma feomelanina, e, na ausência da dopaquinona, forma-se a eumelanina (Ito, 2003).

No melasma, ocorre hiperpigmentação melânica e proliferação vascular, resultando em aumento da pigmentação focal. Há aumento de melanossomas maduros (tipos III e IV), repletos de eumelanina, além de maior transferência de melanossomas dos melanócitos para os queratinócitos adjacentes, tal qual ocorre em fototipos mais pigmentados (Miot, 2009)(Figura 11).

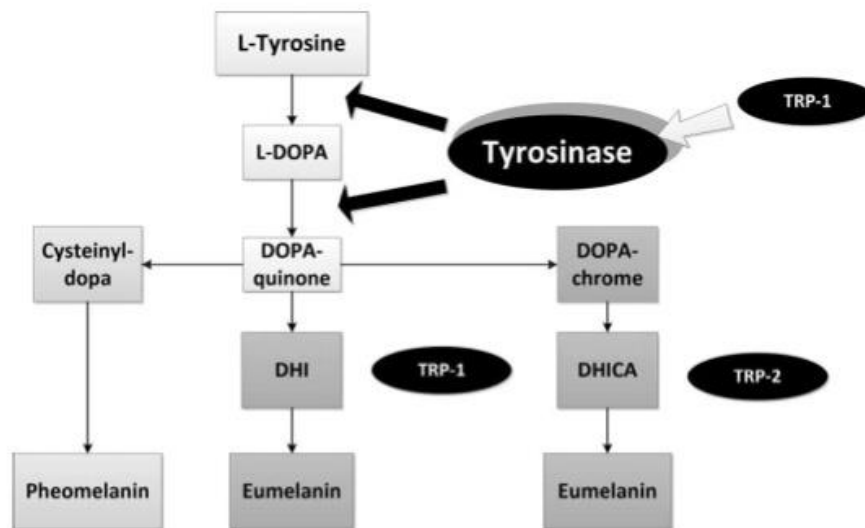


Figura 10. Esquema de formação da eumelanina e feomelanina (Fonte: Videira, 2013).

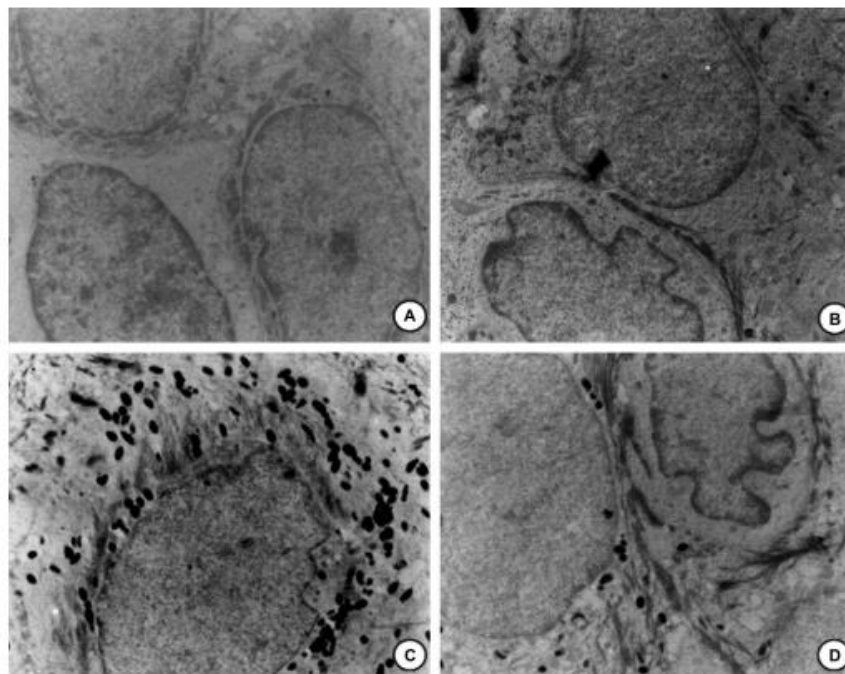


Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão. Melanócitos (à direita B & D) e queratinócitos (à esquerda A & C) demonstrando maior transferência de melanossomos maduros para os queratinócitos no melasma (abaixo C & D), que na pele são adjacente (acima A & B) (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

A eumelanina absorve e dispersa os raios ultravioletas (RUV), o que reduz os efeitos nocivos do sol e, por isso, indivíduos morenos tendem a se queimar menos. Já a feomelanina tem potencial

aumentado em absorver RUV e gerar radicais livres, o que causa danos ao DNA celular. Isso justifica porque pessoas mais claras têm maior risco de desenvolvimento de neoplasias cutâneas relacionadas à exposição solar (Miot, 2009).

A regulação da função do melanócito é influenciada por sinais provenientes de queratinócitos vizinhos, fibroblastos, mastócitos e endotélio, assim como por sinais e fatores ambientais autócrinos e pela radiação ultravioleta. Estes fatores podem estimular a melanogênese e por isso acredita-se que possam estar envolvidos na patogênese do melasma (Miot, 2007; Miot, 2009; Lee, 2014) (Figura 12).

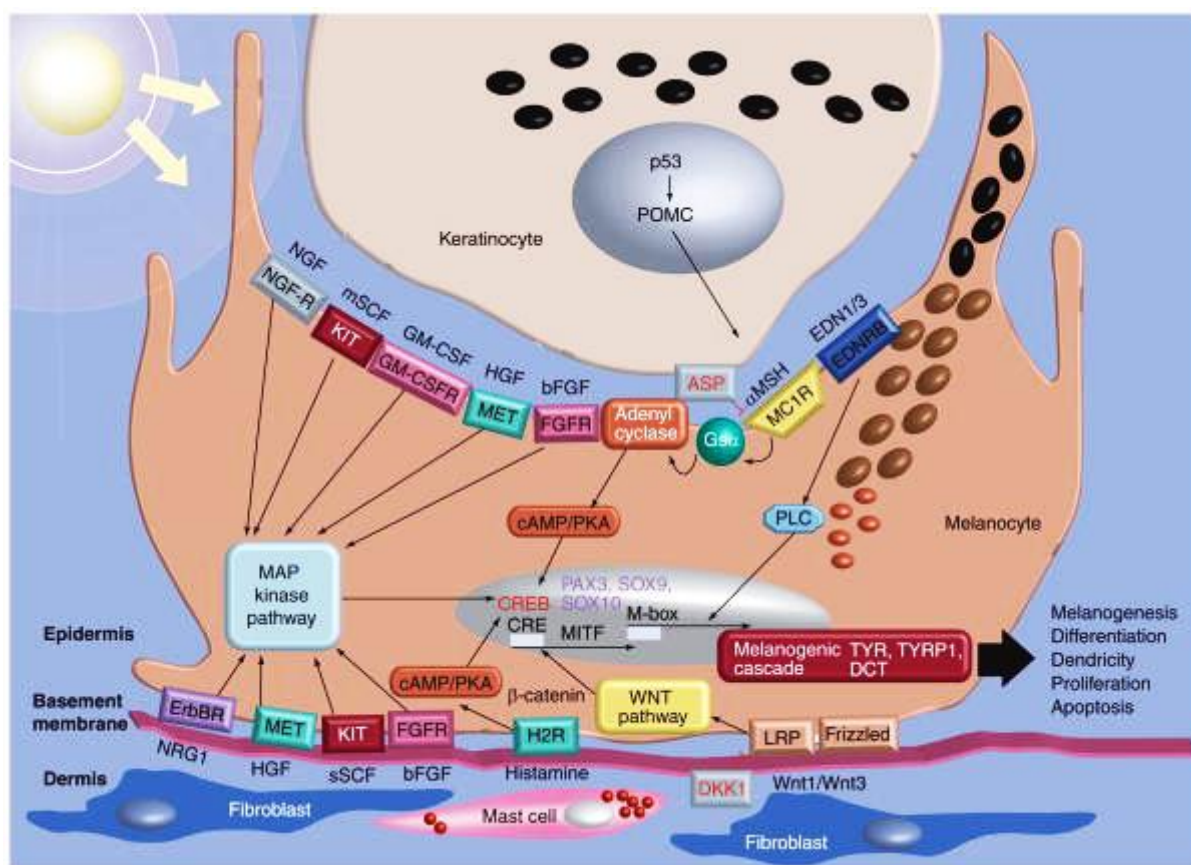


Figura 12. Esquema representativo dos estímulos à pigmentação melânica (Fonte: Yamada, 2013).

Há evidências da participação ativa dos queratinócitos no melasma. Quando comparada à pele normal adjacente, evidenciam-se núcleos maiores (Figura 13) e com maior complexidade de cromatina na camada basal (Brianezi, 2014).

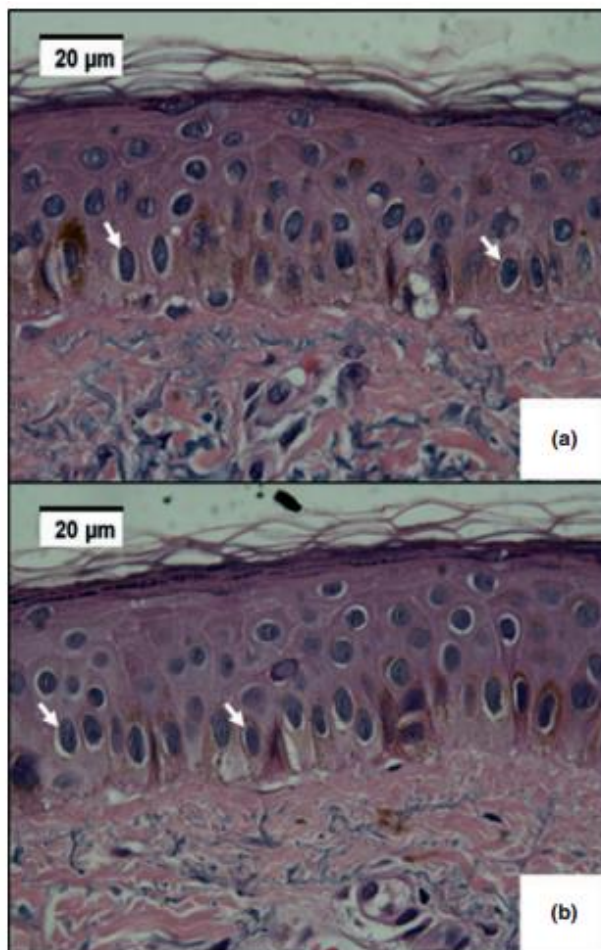


Figura 13. Queratinócitos basais demonstrando maior volume nuclear e heterogeneidade na textura da cromatina do melasma (a) que na pele normal adjacente (b). Destaca-se maior evidência de elastonização do colágeno na derme superficial do melasma (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

O MSH (hormônio estimulador de melanócito) e o ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) são os mais potentes estimuladores da melanogênese. Eles pertencem a uma família de peptídeos derivados do precursor proopiomelanocortina (POMC), sintetizados pela hipófise, melanócitos, células de Langerhans e queratinócitos epidérmicos. Um fator interessante é que a expressão de POMC no epitélio é induzida por UV, ésteres de forbol e interleucinas (Jimbow, 1999; Lee 2014).

Os efeitos do alfa-MSH são mediados pelo MC1-R (receptor de melanocortina 1), o qual é expresso na superfície dos melanócitos, sendo considerado o ponto chave para a pigmentação (Miot, 2009). Esse peptídeo, quando ativado, sinaliza um aumento na razão eumelanina/feomelanina. No epitélio com melasma, há maior secreção de alfa-MSH (Figura 14) e indícios de maior expressão de MC1-R. A investigação de mediadores que levem à produção aumentada e diferencial do MSH no melasma pode aludir a novas propostas terapêuticas primárias na doença.

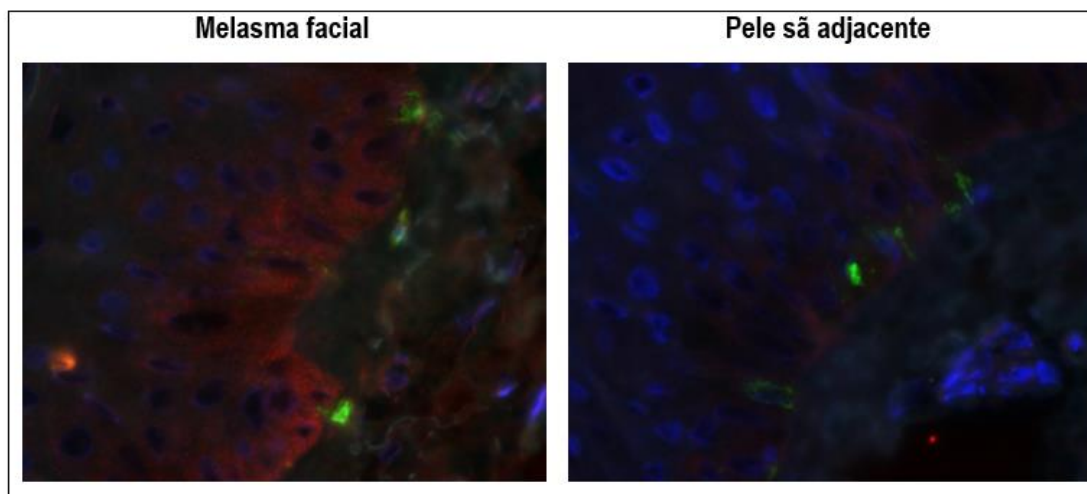


Figura 14. Imunofluorescência direta de tripla marcação mostrando maior expressão de MSH (vermelho) no epitélio com melasma, em comparação com a pele saudável. Melan-A marcando melanócitos em verde e núcleos marcados em azul (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

A expressão de p53 aumenta sempre que a pele é irradiada por raios UV. O p53 medeia a expressão de MSH epidérmico induzido por UV, porém, o aumento dessa expressão também ocorre por estímulos inflamatórios através de vias alternativas (Hall, 1993). No melasma, a expressão de p53 não está diferentemente expressa entre a pele com doença e a adjacente, sugerindo que a radiação UV não seja a fonte primária para estímulo da hipersecreção de MSH, mas apenas um fator epigenético que medeia a síntese aumentada de melanina nessa pele (dados ainda não publicados).

O gene AGOUTI, o qual foi recentemente clonado, está localizado no cromossomo 2 e codifica a proteína ASIP, composta por 31 aminoácidos, e age como antagonista competitivo de MC1-R, bloqueando sua ativação pelo alfa-MSH. Em melanócitos humanos normais, onde o número de MC1-R expresso é relativamente baixo, ASIP anula completamente os efeitos estimulatórios de alfa-MSH na proliferação melanocítica e melanogênese (Miot, 2009). Recentemente, um estudo do nosso grupo comparou a imunofluorescência direta da proteína ASIP da área de pele com melasma e pele saudável adjacente e não encontrou diferença estatisticamente significativa entre as topografias (dados ainda não publicados).

Da mesma forma, a expressão de COX-2 (ciclooxigenase 2) epidérmica (Figura 15) induzida por radiação UV ou dano estrutural, o que subsidiaria a gênese de prostaglandinas, com ação diretamente no melanócito e liberação de MSH, não está expressa diferencialmente entre as peles saudáveis e doentes (dados não publicados). O que leva à hipótese que o processo inflamatório dérmico e a

reatividade da unidade epidermo-melânica não dependa de inflamação primária via COX-2. Nosso grupo está investigando a expressão de IL-1 no epitélio para subsidiar essa hipótese. Entretanto, o estímulo primordial para a síntese de mediadores inflamatórios na pele com melasma permanece incompreendido.

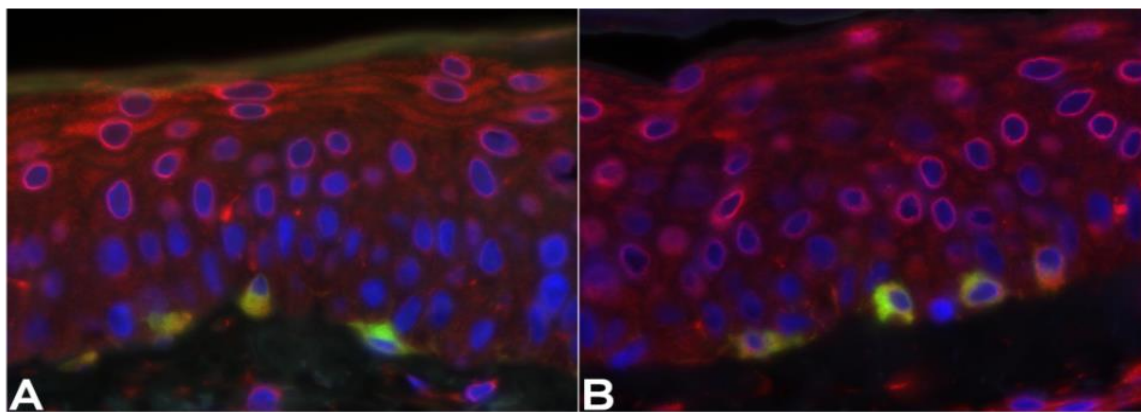


Figura 15. (A) Melasma. Imunofluorescência de dupla marcação para COX2 (vermelho) e Melan-A (verde) (B) Pele sã adjacente (Fonte: Departamento de Dermatologia – FMB-Unesp).

Alguns estudos mostraram aumento na produção de fator de célula tronco (SFC) pelos fibroblastos na derme de pacientes com melasma comparado com a pele perilesional (Torres, 2011; Kang, 2006). O receptor de SFC é o proto-oncogene c-KIT, com atividade tirosina kinase intrínseca, o que desempenha papel importante no desenvolvimento melanocítico humano. (Sulaimon, 2003). A razão pela qual fibroblastos secretam mais SFC no melasma, em comparação com pele adjacente, também não é compreendida.

A RUV, especialmente UVA, é capaz de induzir a produção de citocinas melanogênicas – tais como fator de crescimento de hepatócitos e SFC, – e metaloproteinases (MMP) diretamente a partir dos fibroblastos dérmicos, além da promoção de óxido nítrico sintase induzida e estresse oxidativo local (Lee, 2015). Ademais, a elastose solar apresenta 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.

Além desses elementos citados anteriormente, foram indentificados maiores expressões de outros peptídeos exercendo regulação autócrina ou parácrina dos melanócitos, na pele humana, e em diversas doenças pigmentares. São representados por:

- Endotelina-1 (ET-1): é um peptídeo com propriedades vasoativas, isolado primeiramente de células endoteliais e, mais tarde, verificou-se ser sintetizada e segregada também por queratinócitos, principalmente após exposição a raios UV. O efeito global da ET-1 é o aumento da dendricidade dos melanócitos e o aumento da migração e melanização dos melanócitos.(Tamega, 2015)
- iNOS: a enzima óxido Nítrico Sintetase induzida (iNOS) é expressa pelos melanócitos em resposta ao TNF-alfa, IFN-gama, lipopolissacarídeos e radiação ultravioleta e está aumentada nas peles com melasma (Jo, 2009). É responsável pela produção de Óxido Nítrico (NO) pelas células endoteliais, melanócitos e queratinócitos. O NO, gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintetase, aumenta a sensibilidade dos melanócitos ao alfa-MSH e conseqüentemente aumenta a expressão do receptor MC1-R (Dong Y, 2010)
- NGF: o fator de crescimento neural está envolvido na regulação da melanogênese e/ou dendricidade dos melanócitos. A produção e liberação deste fator de crescimento é estimulado pela RUV, sugerindo outra influência parácrina dos queratinócitos nos melanócitos (Tamega, 2015).
- HGF: o fator de crescimento hepatocítico exerce forte influência na degradação da matriz extracelular, proliferação e mobilidade celular e na angiogênese. O HGF se liga ao seu receptor específico e ativa MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), provocando o aumento da regulação de proteínas necessárias para a proliferação de melanócitos.
- VEGF: A análise microscópica da pele com melasma mostrou que o número e o tamanho dos vasos sanguíneos estava aumentada na pele com doença quando comparada à pele sã, através de estudo imunistoquímico do antígeno relacionado ao fator VIIIa (Kim, 2007). A expressão aumentada de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) nos queratinócitos na pele com melasma favorece da atuação desta proteína na fisiopatologia da doença (Kwon, 2014).

A prevalência aumentada no sexo feminino, o surgimento de lesões durante a gravidez, após introdução de contraceptivos orais ou reposição hormonal, indicam o papel da influência hormonal no aparecimento do melasma. No entanto, a dosagem hormonal sérica destas pacientes não é alterada, e isso sugere que haja um possível aumento na expressão de seus receptores nas áreas com melasma (Sacre, 1996).

Os estrôgenios aumentam a vascularização da pele e suprimem a atividade da glândula sebácea, além de aumentar a atividade das células pigmentares (Lieberman, 2008). Estudos demonstraram que cultura de melanócitos humanos expressam receptores de estrogênio e que o estradiol aumenta os níveis de TYR (tirosinase), TYRP1 (proteína 1 relacionada à tirosinase) e TYRP2 (proteína 2 relacionada à tirosinase), enzimas envolvidas na eumelanogênese humana, dentro dos melanócitos humanos normais (Toyoda, 1998). Uma das formas de estrogênio, o beta estradiol, aumenta os níveis de RNAm (RNA mensageiro) de MC1-R, que é fundamental na produção de melanina, o que pode justificar o papel deste hormônio na pigmentação cutânea (Scott, 2002).

A relação da progesterona na pigmentação na pigmentação melânica ainda não é definida, porém, este hormônio está marcadamente elevado na gravidez, fase em que há surgimento de melasma. Alguns estudos mostraram que a progesterona aumenta o número de células e atividade da TYR em melanócitos (Tamega, 2015) (Figura 16).

Outro estudo mostrou que a PDZK1 (PDZ domain protein kidney 1 / PDZ proteína de domínio renal 1) participa da fisiopatologia do melasma, particularmente em ação conjunta com o estrogênio. O estrogênio estimula a PDZK1 e a expressão aumentada desta proteína aumenta a atuação da tirosinase e a transferência de melanossomas para os queratinócitos (Kim, 2012).

Em estudo exploratório de análise genômica, o gene embrionário H19 foi identificado como *downregulated* na pele com melasma. A análise comparativa e quantitativa da presença do gene H19 nas áreas de pele sã e de pele acometida mostrou que o H19 está expresso diferencialmente (depletados) nas áreas com melasma. Testes *in vitro*, a partir de cultura de células mistas (melanócitos e queratinócitos), mostraram, além da expressão aumentada da tirosinase, o aumento da transferência de melanossomas. As amostras depletadas de H19, quando suplementadas com estrogênio, pigmentaram mais (Lee, 2009).

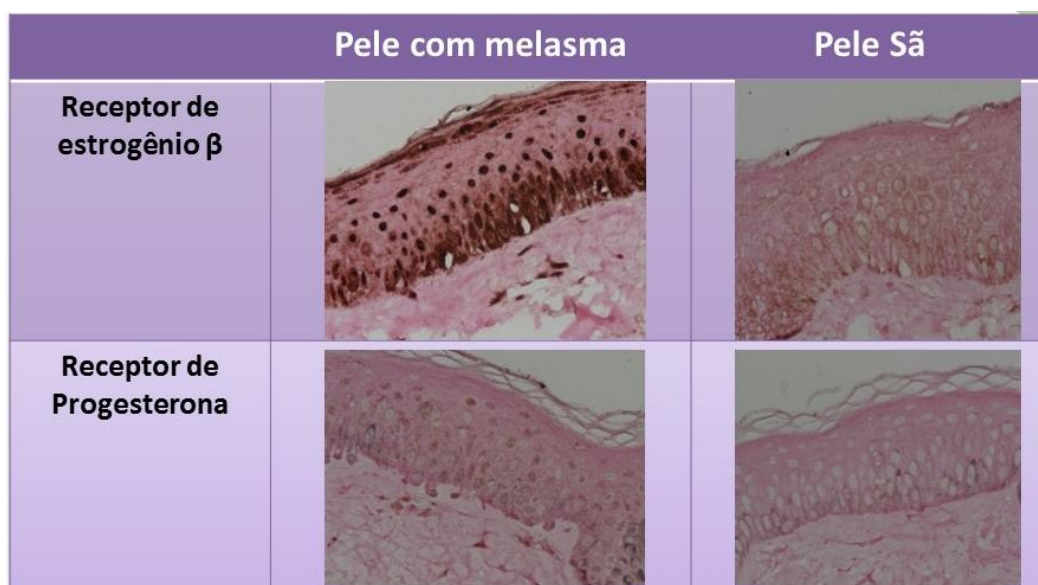


Figura 16. Marcadores de estrogênio e progesterona mostrando aumento da atuação destes hormônios na pele com melasma (Fonte: Tamega, 2015).

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 (Park, 2014). *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 (Yamada, 2013). Dentre as diferentes famílias de moduladores da via Wnt, destaca-se o WIF-1 (fator 1 inibidor de Wnt).

WIF-1, inicialmente descrita como antagonista da via canônica da família Wnt, ainda não tem sua função claramente conhecida. A literatura acumula resultados conflitantes. A depleção do gene WIF-1 tanto em fibroblastos quanto em queratinócitos, mostrou importante estímulo à expressão de tirosinase e à transferência dos melanossomas em melasma (Kim, 2013). No entanto, Park e colaboradores apontaram aumento de WIF-1 na pele com melasma também em cultura (Park, 2014). Em estudo recente de nosso grupo, 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.

A melanogênese é um processo complexo que se desenvolveu em humanos devido a várias pressões seletivas e pode ser induzido por diferentes estímulos, sendo a RUV o principal deles, entretanto, diversas doenças promovem hiperpigmentação melânica por diferentes mecanismos, como

a hiperpigmentação pós-inflamatória, eritema *ab igne*, urticária pigmentosa, nevus melanocíticos, lentigos solares, efélides, ocronose e fitofotodermatite. Há, porém, evidências que o melasma constitua uma hiperpigmentação melânica de características independentes das demais dermatoses pigmentares.

Diversos estudos foram conduzidos na tentativa de elucidar a fisiopatologia e as alterações presentes na pele do melasma e assim viabilizar tratamentos mais efetivos aos pacientes, já que o elemento causal – que deflagra todas as alterações inflamatórias e estruturais - não é conhecido. Neste âmbito, o entendimento da estrutura da pele, dos hormônios atuantes, dos receptores presentes e dos mecanismos de melanogênese proporcionaram o avanço nesta doença.

É neste contexto que o estudo proteômico da pele pode auxiliar na prospecção desses resultados, identificando a expressão diferencial de peptídeos na pele com melasma e sã, visando o desenho mais detalhado da rede de sinalização que comanda a pigmentação no melasma.

Proteômica Clínica

A Proteômica estuda o conjunto de proteínas e suas isoformas contidas em uma amostra biológica, seja esta uma organela celular, uma célula, um tecido ou um organismo propriamente dito. Este conjunto de proteínas é obtido a partir do genoma e dependente dos seus fatores de regulação (Anderson, 2000).

Mais especificamente, a proteômica tem possibilidade de estudar e determinar:

- 1- O produto de um gene, que muitas vezes é impossível de ser obtido a partir da sequência do DNA;
- 2- Mecanismos como a regulação de proteínas funcionais por proteólise e sua influência na regulação gênica;
- 3- A interação entre proteínas;
- 4- A composição molecular de estruturas celulares como organelas, em escala proteica;
- 5- Indicar se a regulação de um determinado gene ocorre durante a transcrição ou tradução.

A análise do proteoma é metodologicamente diferente do sequenciamento genômico. Estudos envolvendo proteoma incluem extração de proteínas, separação, quantificação e por último a identificação por espectrometria de massas (MS) e análises por bioinformática. A espectrometria de massas baseada no proteoma tornou-se uma poderosa ferramenta para análises qualitativas (presença/ausência) e quantitativas (intensidade de *spots*) de um grande número de proteínas em um fenômeno biológico (Emidio, 2016).

Em dermatologia, é crescente o estudo proteômico em doenças como melanoma, leishmaniose tegumentar, psoríase, micose fungoide, dermatite atópica e dermatite de contato.

No melanoma, uma das frentes de estudo se baseia na avaliação da modificação do proteoma nos estágios de desenvolvimento do tumor e foi visto redução nas expressões de diversas proteínas tumorais durante sua evolução (Souza, 2004; Sabel, 2011). Da mesma forma, tem sido estudado a proteômica dos melanomas metastáticos, para avaliação do comportamento proteico mediante tratamentos quimioterápicos específicos (Huang, 2009).

Na leishmaniose tegumentar, existem estudos de avaliação proteômica antes e depois do tratamento para a doença e com diferentes subtipos de espécies de leishmania, evidenciando a presença de diversas proteínas inflamatórias na doença sem tratamento (Santos, 2015).

Outro estudo proteômico determinou padrões de expressões de proteínas séricas para distinguir pacientes com micose fungoide de pacientes com psoríase e de pacientes sem doença cutânea (Cowen, 2007).

Na dermatite atópica, proteômica foi utilizada como técnica para identificar biomarcadores que otimizassem o diagnóstico de eczema herpético e de colonização estafilocócica nos pacientes atópicos (Broccardo , 2011).

Já na dermatite de contato, Boxman e colaboradores pesquisaram, através da proteômica, marcadores que tiveram sua expressão modificada na pele após irritação por alérgeno (Boxman, 2002).

Proteômica pode favorecer identificação de pacientes com diferentes respostas a fármacos e prever desfechos em tratamentos clínicos. Mas, sua principal aplicação ainda é na exploração de redes de proteínas para elucidação fisiopatológica de doenças, respostas ao tratamento e identificação de biomarcadores.

Estratégias de Separação de Proteínas

As estratégias investigativas de proteínas mais utilizadas são: estratégia tradicional, vinculada ao uso de géis de eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) (Figura 17) e a estratégia *shotgun*. Atualmente, a técnica de gel 2D é capaz de resolver um grande número de misturas complexas de proteínas, combinando a focalização isoeétrica e a massa molecular relativa de cada proteína, melhorando a identificação e a caracterização de diferentes isoformas de proteínas. O gel 2D-SDS-PAGE tem um excelente poder de resolução de proteínas intactas, embora seja um processo difícil para automatizar, trabalhoso e de baixa reprodutibilidade. No entanto, ainda é uma abordagem poderosa para diferenciar isoformas de proteínas e estados de modificações pós-traducionais, e deve continuar a servir bem neste papel (Motoyama et al, 2008).

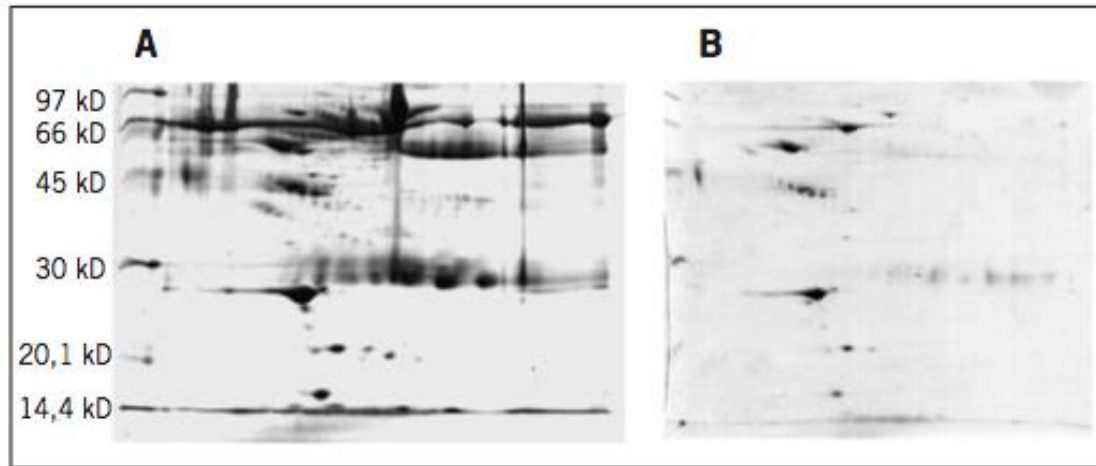


Figura 17. Exemplo de Eletroforese de Proteínas bidimensional (2-DE). (A) Presença de proteínas e (B) Depleção de proteínas. (Fonte: Barbosa, 2012)

A estratégia *shotgun* compreende a produção de uma mistura complexa de peptídeos, obtidos por tratamento enzimático com tripsina das proteínas totais presentes de uma amostra biológica (Figura 18). A cromatografia líquida de fase reversa (HPLC-RP) acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS) foi desenvolvida para automação dos métodos de análise em larga escala e utiliza diferentes características das proteínas em colunas de propriedades distintas ou em uma única coluna bifásica. As frações peptídicas eluídas pela HPLC-RP são diretamente introduzidas no espectrômetro de massas. A abordagem *shotgun* possibilita uma maior resolução dos proteomas, facilitando a identificação das proteínas menos abundantes, frequentemente perdidas quando utilizados os géis (Motoyama et al, 2008).

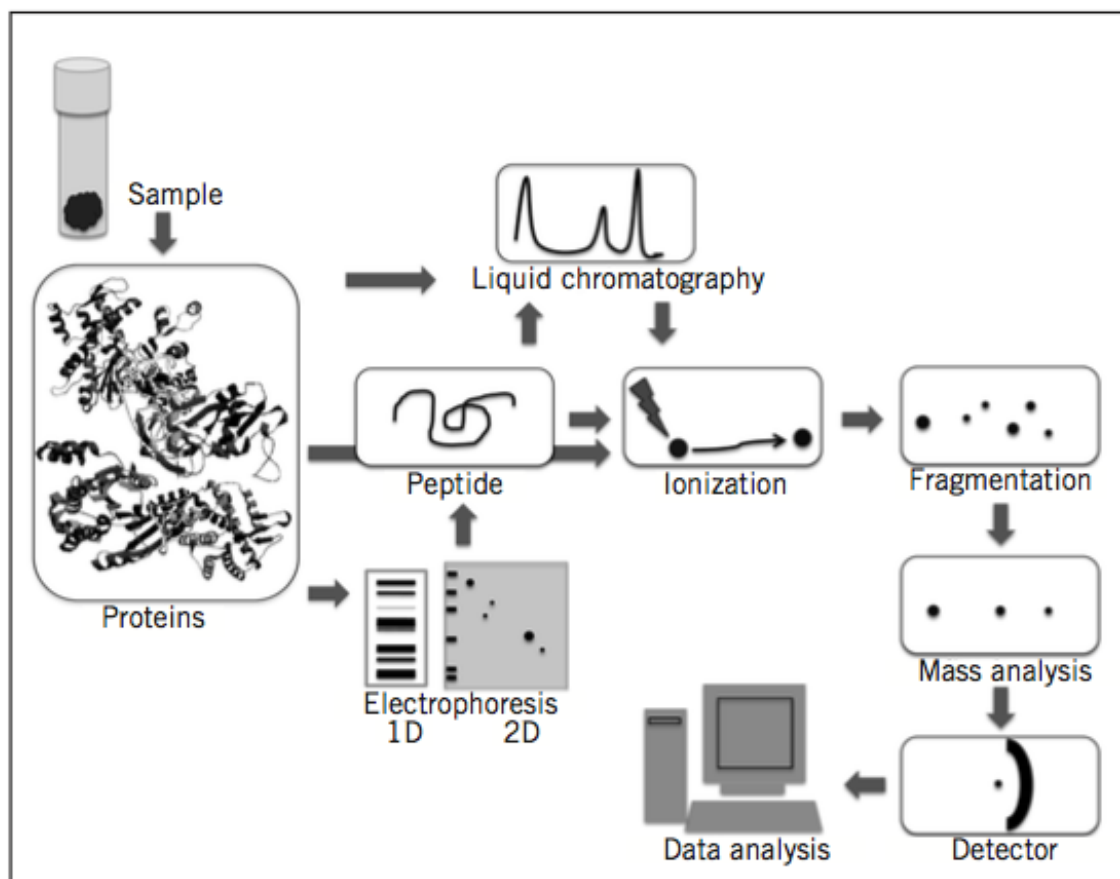


Figura 18. Diferentes estratégias de separação de proteínas: separação por eletroforese uni (1-D) ou bidimensional (2-D) e cromatografia líquida seguidos de ionização, fragmentação, análise peptídica e detecção e análise de dados (Fonte: Barbosa, 2012).

Abordagem de Análises Proteômicas

As informações sobre o proteoma de uma amostra podem derivar da análise de proteínas intactas (proteômica *top-down*) ou de seus peptídeos (proteômica *bottom-up*).

Na proteômica *bottom-up*, as proteínas de uma mistura são digeridas, e os peptídeos resultantes são analisados por MS. As limitações dessa estratégia podem estar na cobertura incompleta da sequência das proteínas, na perda das modificações pós-traducionais e nas degradações como resultado da digestão proteolítica.

Já a análise *top-down* permite deduzir a estrutura primária da proteína e a maior parte das modificações pós-traducionais (Wu, 2012) (figura 19). No entanto, essa estratégia é limitada pela energia de colisão necessária na fragmentação da proteína que é insuficiente para proteínas maiores que 50 kDa, ficando restrita sua aplicação à análise de proteínas purificadas (Nesatyy, 2008).

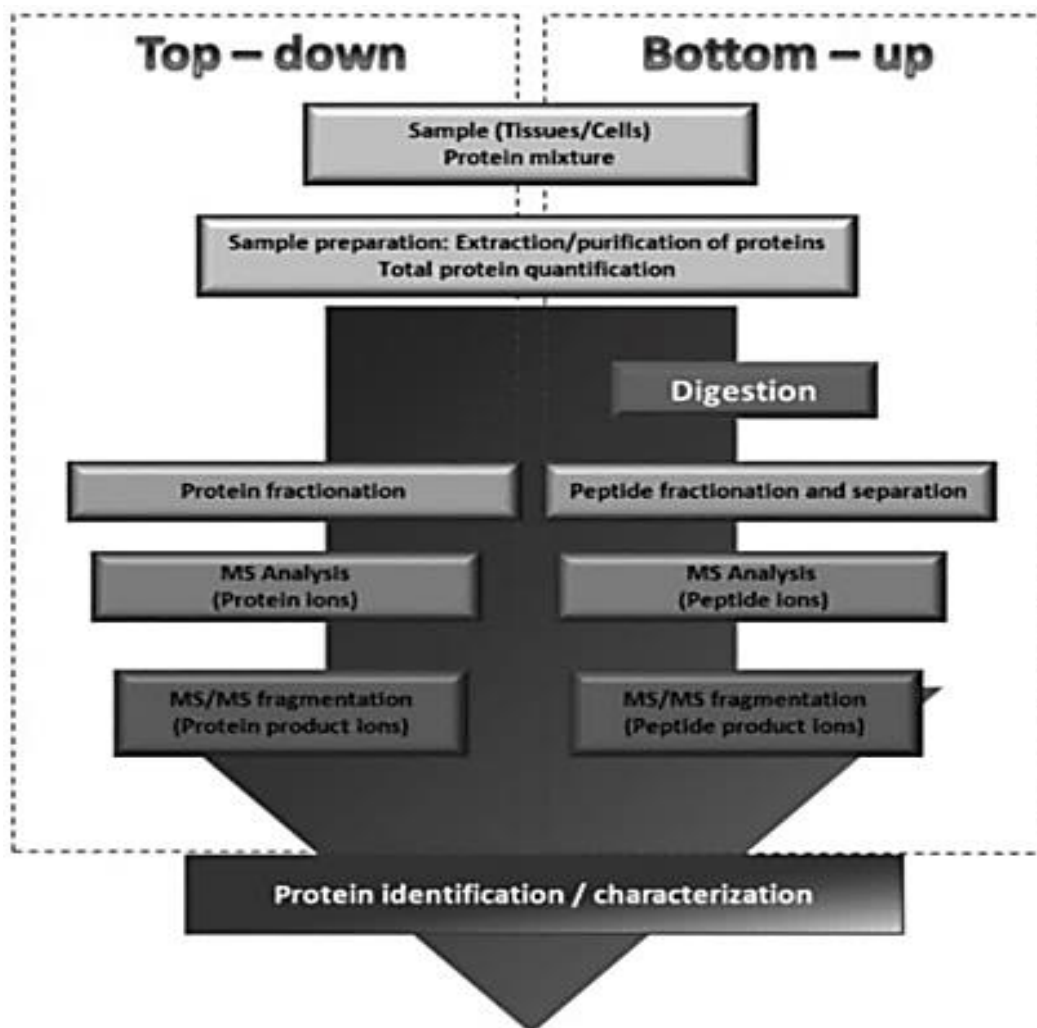


Figura 19. Representação da abordagem proteômica Bottom-up e Top-down (Fonte: Cifuentes, 2013)

Espectrometria de Massas

A identificação de proteínas por meio da espectrometria de massas depende da digestão proteolítica que produz uma coleção de peptídeos que são ionizados por técnicas de ionização suave como ionização por eletrospray (ESI – *Electrospray ionization*) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – *Matrix-assisted laser desorption ionization*).

Após a ionização, analisadores de massas detectam as relações massa/carga (m/z) e os espectros resultantes e relacionam a abundância dos fragmentos versus a relação m/z , os quais são então confrontados nos bancos de dados para a identificação das proteínas. Um espectro de massas (figura 20) consiste em um gráfico em que o eixo X corresponde ao m/z e o eixo Y corresponde a

intensidade relativa de cada espécie em relação ao pico mais abundante.

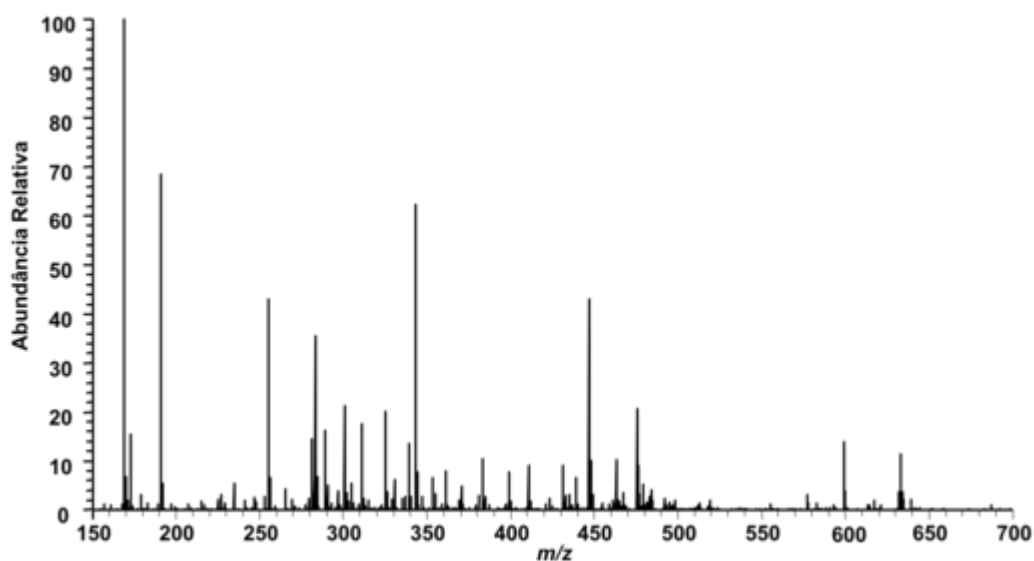


Figura 20. Espectro de massas mostrando no eixo Y a intensidade de sinal de cada proteína identificada (Fonte: <http://www.espectrometriademassas.com.br>)

Na MS, a proteína é identificada por correlação com sequências depositadas em banco de dados públicos, utilizando-se de parâmetros restritos, tais como grupo de massas de peptídeos e sequências de aminoácidos parciais ou totais obtidas de peptídeos que foram produzidos por proteólise limitada.

Análises das Proteínas

No campo de análises proteicas, a demarcação isóbara (iTRAQ) para quantificação absoluta e relativa e a quantificação livre de marcação (*Label-free*) são as estratégias mais utilizadas na espectrometria de massas do tipo *shotgun*.

A marcação com isóbaros iTRAQ se baseia na derivação de grupos amino primários de peptídeos obtidos após o processo de digestão enzimática. Essa estratégia permite marcar peptídeos de diferentes amostras com diferentes isóbaros (8 plex, m/z 113, 114, 115, 116, 117 e 118). Essas amostras são reagrupadas após a derivação química, separadas por cromatografia líquida e, posteriormente, submetidas às análises em espectrometria de massas. Durante o processo de fragmentação dos íons peptídeos tripsínicos que foram marcados, ocorre a formação de íons repórteres

de baixa massa molecular (m/z 113, 114, 115, 116, 117 e 118 – *loss mass zoom*) que são utilizados para a quantificação relativa da proteína nas diversas amostras em uma única análise, seguindo o princípio da diluição isotópica.

O grande benefício das técnicas marcadas com isóbaros se remete à relação estequiométrica entre as leituras do espectrômetro de massas e a concentração da proteína no fluido ou tecido biológico. Embora essa técnica esteja razoavelmente bem estabelecida, existem diversas razões que a torna não muito valorosas. Em geral, todas essas razões confrontam a relação custo-benefício e a flexibilidade do experimento. Por isso, a abordagem da quantificação livre de marcação (*Label-Free*) tem se tornado cada vez mais popular e aplicável a diferentes tipos de análises e experimentos (Emidio, 2016).

A abordagem de quantificação livre de marcação baseada em *Extracted Ion Chromatogram* (XIC), possibilitada pelo recente avanço de algoritmos e melhoria na instrumentação da espectrometria de massas, substituiu trabalhosas e custosas etapas bioquímicas por procedimentos de bioinformática (America, 2008). Nesta abordagem, cada amostra é medida em aquisições LC-MS/MS independentes e as intensidades de cada distribuição isotópica característica de um peptídeo são integradas ao longo do tempo de eluição cromatográfica e consideradas como “*features*” quantitativos.

Os “*features*”, aqui chamados fatores, são alinhados entre diferentes aquisições a partir do uso das massas acuradas considerando-se o possível deslocamento de massa. O resultado é um mapa mestre com todos os fatores referentes às intensidades reportadas ao longo de um número teórico ilimitado de aquisições. A abundância desses fatores comparados entre corridas cromatográficas revela diferenças relativas entre quantidades de peptídeos. As sequências de peptídeos obtidos do espectro MS/MS vindos do banco de dados são cruzadas com o mapa mestre, ou técnicas confirmatórias, como *Western blot*.

Misturas de proteínas de qualquer origem são diretamente analisadas de modo tecnicamente idêntico, o que torna o método atrativo para quantificar o proteoma de tecidos individuais ou organismos inteiros (Meng, 2011; Oswald, 2011). A figura 21, obtida e modificada de Zhu *et al.* (2010) destaca as diferenças gerais entre as abordagens de quantificação livre de marcação e baseada em marcação.

As estratégias de análise *label-free*, devido às diferentes taxas de ionização dos fragmentos de proteínas na mistura, não apresentam correlação estequiométrica entre a abundância das proteínas identificadas no espectro analisado e a sua concentração no tecido. Entretanto, a variação das

abundâncias podem ser comparadas em diferentes grupos amostrais, no mesmo experimento, permitindo a inferência da variabilidade de uma mesma proteína entre grupos (p.ex. saudável x doente), assim como, a correlação entre as variações das abundâncias (escalonadas) entre os sujeitos da amostra.

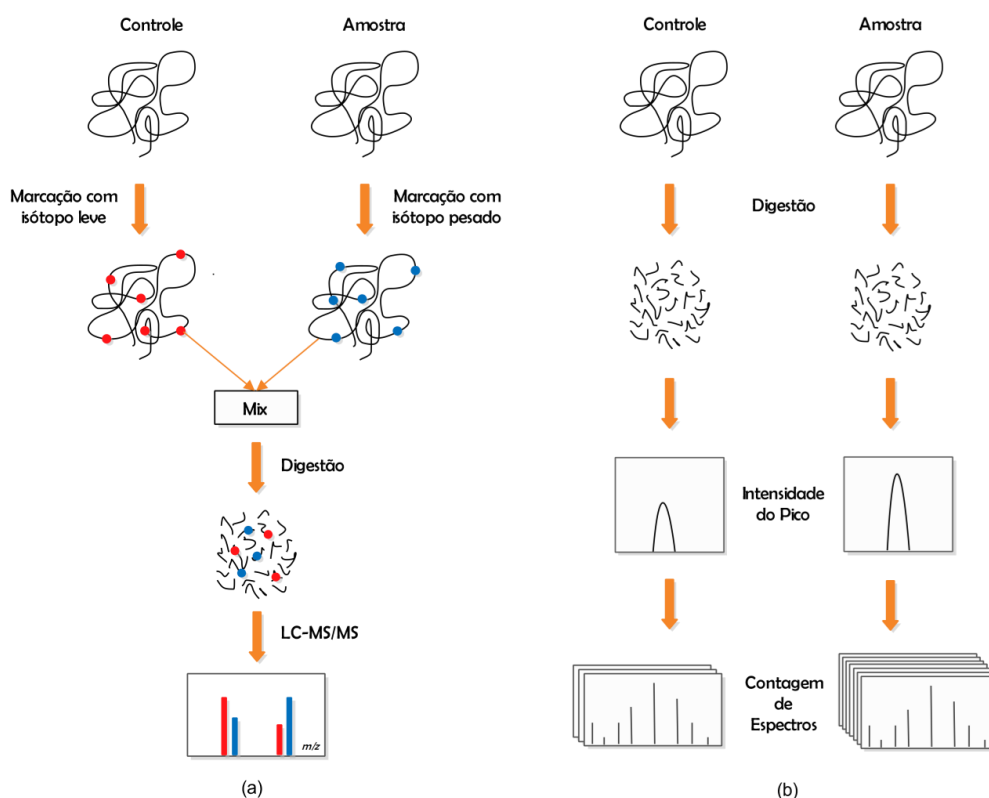


Figura 21. Esquema da análise proteômica quantitativa baseada em marcação *versus* sem marcação. (a) Fluxo de trabalho quando usada a abordagem baseada em marcação com isótopos estáveis. (b) Fluxo de trabalho quando usada a abordagem livre de marcação, a qual também pode estar relacionada a contagem de espectros como uma estratégia de análise quantitativa (Fonte: Zhu, 2010).

As proteínas identificadas no processo são comparadas entre os grupos estudados por técnicas de bioinformática a fim de selecionar o grupo que melhor representa as diferenças entre as amostras. Finalmente, são exploradas, em bancos de dados públicos, as relações e interações entre as proteínas identificadas diferencialmente na análise (Figura 22). Esse passo permite a elaboração de hipóteses translacionais que definam as vias metabólicas envolvidas na fisiopatologia da doença estudada.

Em tempo, a análise proteômica *label-free* constitui uma técnica exploratória, sem hipótese prévia a ser testada, mas que permite o reconhecimento de padrões de proteínas identificadas e levam à idealização de modelos fisiopatológicos. As técnicas estatísticas convencionais baseadas nos testes de hipótese não se aplicam adequadamente à realidade em que, geralmente, identificam-se mais

variáveis (grupos de proteínas), que sujeitos amostrados, exigindo uso de técnicas de base espacial (p.ex. análise de componentes principais) ou de simulação (p. ex. Monte Carlo), visando a escolha *a priori* dos grupos candidatos à análise pormenorizada.

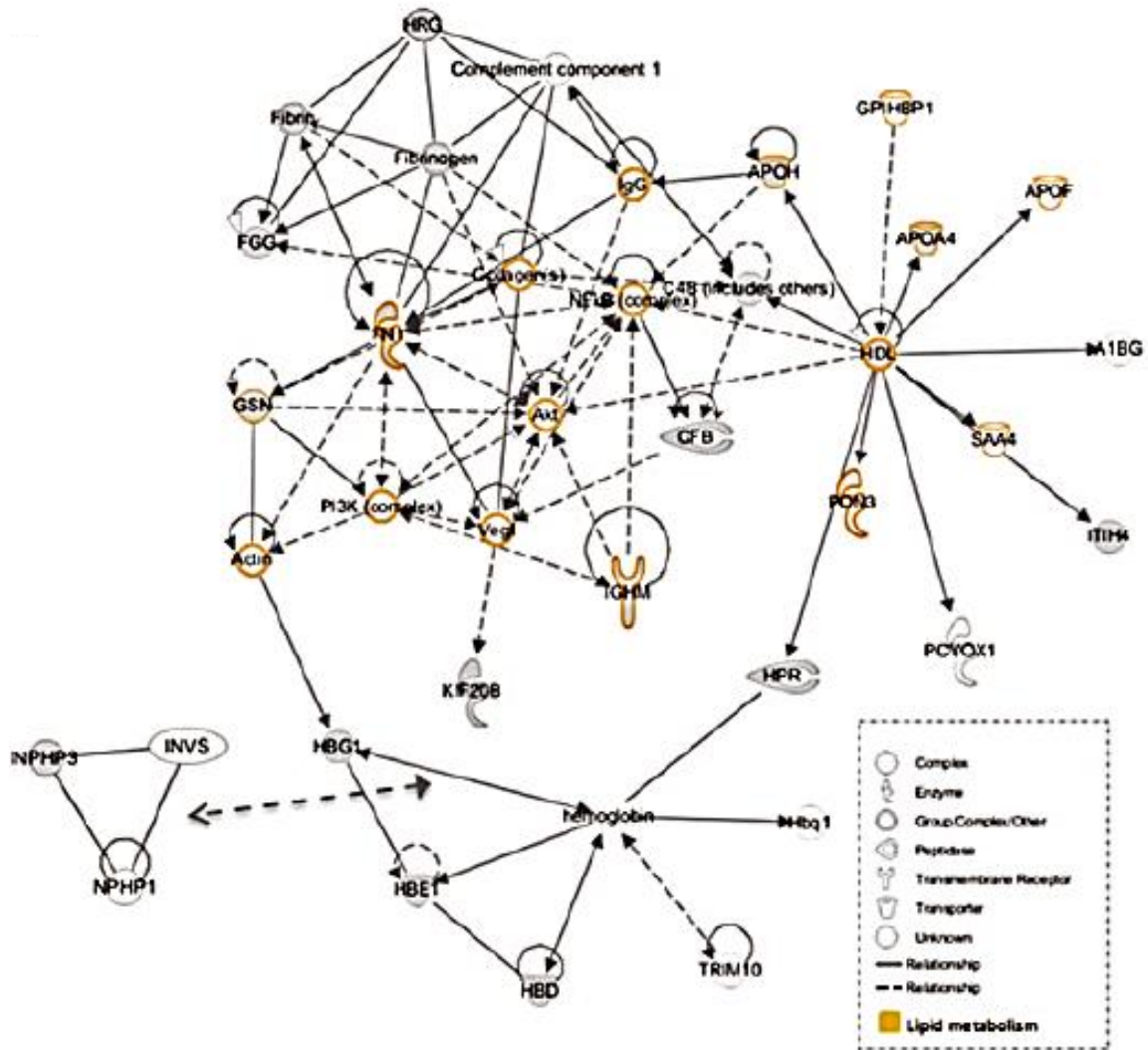


Figura 22. Exemplo de resultado da prospecção da interação (rede) entre proteínas diferencialmente expressas nos tecidos. (Fonte: Pizzatti, 2012).

Desta forma, o uso de ferramentas proteômicas como espectrometria de massas auxiliam na caracterização da rede de proteínas diferencialmente expressas e contribuem para o real entendimento de doenças, inclusive cutâneas, as quais oferecem um campo vasto de etiologias não esclarecidas e processos patológicos complexos.

Proteômica da pele

Apesar da importância da pele como maior órgão do corpo humano e a facilidade de extração de material biológico para pesquisa, há, relativamente, poucos estudos proteômicos da pele, na literatura. Através de pesquisa no *pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) constataram-se (em 18/dez/2017) 1011 artigos para a pesquisa “*skin AND proteomics*”, enquanto que outros órgãos como fígado e coração apresentam 3362 e 2181, respectivamente.

A justificativa para esta menor quantidade de estudos pode advir de que, embora a matriz extracelular seja uma composição complexa de proteínas numerosas, incluindo colágenos e glicoproteínas que proporcionam aos tecidos associados suas características estruturais e funcionais únicas (Mikesh, 2013), a pele se mostra um tecido difícil de analisar com o uso tradicional de técnicas proteômicas devido ao alto teor de lipídios, insolubilidade e extensa reticulação de proteínas, além de grande quantidade de proteases que são ativadas imediatamente após a coleta dos espécimes e durante o processamento (Bliss, 2016). Estas características podem atrapalhar o isolamento e a digestão de proteínas para identificação na espectrometria de massa.

Sabe-se, no entanto, que a proteômica se mostra cada dia mais importante como instrumento de investigação fisiopatológica em todas as doenças, o que nos leva a crer que isso ampliará o incentivo a encontrar estratégias eficazes para abranger as doenças da pele.

Cabe aos dermatologistas e cientistas biomédicos desenvolver técnicas que otimizem a extração e análise de proteínas da pele.

Referências

- America AH, Cordewener JHG. Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys. *Proteomics*. 2008; 8(4): 731-49.
- Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opin. Biotechnol*. 2000; 11: 408-12.
- Barbosa EB, et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*. 2012; 58(3): 366-75.
- 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.
- Bliss E, et al. An optimised method for the proteomic profiling of full thickness human skin. *Biological procedures online*. 2016; 1891: 15.
- Boxman ILA, et al. Proteomic analysis of skin irritation reveals the induction of HSP27 by sodium lauryl sulphate in human skin. *Br J Dermatol*. 2002; 146(5): 777-85.
- Brianezi G, et al. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015; 29(4): 809-12.
- Broccardo CJ, et al. Comparative proteomic profiling of patients with atopic dermatitis based on history of eczema herpeticum infection and *Staphylococcus aureus* colonization. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(1) : 186-93.
- Chang MW. Distúrbios de Hiperpigmentação. *In: Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Dermatologia*. 2 volumes; 2 ed. Elsevier, 2010: 1052-54.
- Cifuentes, Alejandro. *Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition*. John Wiley & Sons. 2013; 52.
- Cowen EW, et al. Differentiation of tumour-stage mycosis fungoides, psoriasis vulgaris and normal controls in a pilot study using serum proteomic analysis. *Br J Dermatol*. 2007; 157(5): 946-53.
- Dale PD, Sherratt JA, Philip KM. A mathematical model for collagen fibre formation during foetal and adult dermal wound healing. *Proc R Soc B*. 1996; 263.1370: 653-60.
- Davis EC, Callender VD. Postinflammatory hyperpigmentation. *J Clin Aesthetic Dermatol*. 2010; 3(7): 20-31.
- D'Elia, Maria Paula Barbieri, et al. African ancestry is associated with facial melasma in women: a cross-sectional study. *BMC medical genetics*. 2017;18(1): 17.
- Dong Y, et al. Nitric Oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to alpha- receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 396(4): 849-53.
- Emidio NB, et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. *HU Revista*. 2016; 41: 101-11.
- Espectrometria de Massas. Disponível em: <[https:// www.espectrometriademassas.com.br](https://www.espectrometriademassas.com.br) > Acesso em: 15 de outubro de 2017
- Freitag FM, et al. Effect of melasma of life in a sample of woman living in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22:655-62.
- Hall PA, et al. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*. 1993; 8(1): 203-07.
- Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: uma revisão clínica e epidemiológica. *An Bras Dermatol*. 2014; 89(5):772-83.
- Huang SK, et al. LC/MS-based quantitative proteomic analysis of paraffin-embedded archival melanomas reveals potential proteomic biomarkers associated with metastasis. *PLoS ONE*. 2009; 4(2): e4430.
- Ishiy PS, et al. Skin diseases reported by workers from the campus of UNESP Rubião Jr, Botucatu-SP (Brazil). *An Bras Dermatol*. 2014; 89:529-31.

- Ito S. A chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 2003;16(3): 230-36.
- Jimbow K, et al. Biology of Melanocytes. *In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF Dermatology in General Medicine.* New York: Mcgraw-Hill; 1999:192-20.
- Jo H, 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):10-16.
- Kang HY, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol.* 2006; 154: 1094-99.
- Kim EH, et al. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci.* 2007;46:111-16. [L1]
- Kim NH, et al. PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in melasma. *Journal of Investigative Dermatology.* 2012; 132(11): 2622-31.
- Kim JY, Lee TR, Lee AY. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J Invest Dermatol* 2013; 133(1): 191-00.
- Kwon SH, Park KC. Clues to the Pathogenesis of melasma from its histologic findings. *Pigmentary Disorders.* 2014; 1: 141-44.
- Lee AY. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatologica Sinica.* 2014; 32(4): 233-39.
- Lee AY. Recent progress in melasma pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28(6): 648-60.
- Lee HS, et al. Treatment of melasma in Asian skin using a fractional 1,550- nm laser: an open clinical study. *Dermatol Surg.* 2009; 35(10): 1499-04.
- Lieberman R, Moy L. Estrogen receptor expression in melasma: results from facial skin of affected patients. *J Drugs Dermatol.* 2008; 7(5): 463-65.
- Maranzatto CFP. Desenvolvimento e validação de um questionário multidimensional de avaliação da qualidade de vida relacionada ao melasma (HRQ-Melasma). *Dissertação de mestrado.* 2016.
- Meng Y, et al. Label-free quantitative proteomics analysis of cotton leaf response to nitric oxide. *J Proteome Res.* 2011; 10(12): 5416-32.
- Mikesh LM, et al. Proteomic anatomy of human skin. *J Proteomics.* 2013; 84: 190-00.
- Miot LDB, et al. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol* 2007; 82: 529–64.
- Miot LDB, et al. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol.* 2009; 84: 623–35.
- Motoyama A, Yates JR. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2008; 80(19): 7187-93.
- Neilson KA, et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics.* 2011; 11(4): 535-53. [L1]
- Nesatyy VJ, Suter MJF. Analysis of environmental stress response on the proteome level. *Mass Spectrometry Reviews.* 2008; 27(20): 556-74.
- Oswald ES, et al. Label-free protein profiling of adipose-derived human stem cells under hyperosmotic treatment. *J Proteome Res.* 2011; 10(7): 3050-59.
- Park TJ, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)- 1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(1): 72-81.
- Pizzatti L, et al. Label-free MSE proteomic analysis of chronic myeloid leukemia bone marrow plasma: disclosing new insights from therapy resistance. *Proteomics.* 2012; 12(17): 2618-31.
- Sabel MS, Liu Y, Lubman DM. Proteomics in Melanoma Biomarker Discovery: Great Potencial, Many Obstacles. *Int J Proteomics.* 2011; 2011.

- Sacre RC, et al. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. *An Bras Dermatol.* 1996; 71: 195-98.
- Santos CS, et al. Proteome profiling of human cutaneous Leishmaniasis lesion. *J Invest Dermatol.* 2015; 135(2):400-10.
- Scott MC, et al. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci.* 2002; 115(11): 2349-55.
- Setaluri V. Autophagy as a melanocytic self-defense mechanism. *J Invest Dermatol.* 2015;135(5):1215-17.
- Sociedade Brasileira de Dermatologia-SBD. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol.* 2006; 81 (6): 549-58.
- Souza GA. Modificação do proteoma dos estágios iniciais da transformação maligna de melanomas. Tese de Doutorado. 2004.
- Sulaimon SS , Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Veter Dermatol* 2003; 14: 57-65.
- Tamega AA, et al. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27:151-56.
- Tamega AA, et al. Gene and protein expression of oestrogen- β and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosm Sci.* 2015; 37(2): 222-28.
- Tamler C, et al. Classificação do melasma pela dermatoscopia: um estudo comparativo com a luz de Wood. *Surg & Cosmet Dermatol.* 2009; 1(3): 115-19.
- Torres AB, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. *Am J Dermatopathol.* 2011; 33(3): 291-95.
- Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol.* 1998; 139: 444-52.
- Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 76-83.
- Wu Q, et al. Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis – A review. *Anal Chim Act.* 2012;731:1-10.
- Yamada T, 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.
- Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2009; 2010.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificação diferencial de proteínas expressas na pele de mulheres com melasma facial e na pele adjacente sem lesão.

Objetivos específicos

1. Avaliação das vias funcionais indicadas pelas proteínas expressas diferencialmente nas peles com melasma e perilesional.
2. Avaliação das interações entre proteínas identificadas na expressão diferencial nas peles com melasma e perilesional.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Título: Estudo proteômico do melasma facial em mulheres.

Title: *Proteomic study of facial melasma in woman.*

Autores:

Luiza Vasconcelos Schaefer

Médica Dermatologista, Mestranda em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil, professora do departamento de dermatologia da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Leticia Gomes de Pontes

Bióloga, MsC, Pesquisadora do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), UNESP, Botucatu, SP/Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan

Bióloga, MsC, Pesquisadora do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), UNESP, Botucatu, SP/Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Lucilene Delazari dos Santos

Bióloga, PhD, Pesquisadora do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), UNESP, Botucatu, SP/Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Hélio Amante Miot

Médico Dermatologista, PhD, Professor adjunto do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Correspondência:

Prof. Hélio Amante Miot

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

Fone/FAX: +55 14 3882-4922

Email: heliomiot@gmail.com

Local de desenvolvimento do trabalho:

Departamentos de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, ambulatório de Dermatologia do Hospital Regional de Presidente Prudente- HRPP, Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da Unesp - CEVAP

Conflito interesse: Nenhum

Financiamento: FUNADERSP: nº. 048/2016

Resumo

Fundamentos: Melasma é uma alteração da pigmentação melânica da pele, adquirida, comum, caracterizada por máculas em geral simétricas, hiperpigmentadas, com margens irregulares e de limites definidos. Embora tenha alta frequência populacional não se conhece completamente a sua fisiopatologia e os estímulos envolvidos na hipertrofia melanocítica e hipermelanogênese focal. A proteômica estuda o conjunto de proteínas e suas isoformas contidas em uma amostra biológica, seja esta uma organela celular, uma célula, um tecido ou um organismo propriamente dito. O uso de ferramentas proteômicas propostas neste trabalho auxiliarão na prospeção da rede de proteínas diferencialmente expressas na pele com melasma e são, adjacente, subsidiando a elaboração de hipóteses fisiopatológicas para a doença.

Objetivo: Identificação diferencial de proteínas expressas na pele com melasma facial e na pele são adjacente de mulheres.

Métodos: Estudo transversal, envolvendo 20 mulheres, maiores de 18 anos, com melasma facial, sem tratamento específico há mais 30 dias, exceto protetor solar. Foram realizadas duas biópsias com *punch* 3 mm na face de cada paciente, sendo uma em região com melasma e outra em pele são adjacente (40 fragmentos). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas, digeridas em tripsina, e, as proteínas extraídas, submetidas à espectrometria de massas. A dimensão do efeito foi estimada pela razão de abundância entre as proteínas identificadas nas topografias (melasma/perilesional).

Resultados: A idade média (desvio-padrão) das pacientes foi de 42,8 (8,9) anos, 45% eram do fototipo IV e 25% exerciam profissões expostas ao sol. A idade de início do melasma foi 29,3 (7,5) anos, 55% das mulheres referiam histórico familiar e 30% usavam anticoncepcional. Foram identificadas 256 proteínas nas amostras. Houve expressão significativamente diferencial entre as topografias para 29 proteínas (25 super-reguladas e 4 subreguladas). ACTG1, ALB, SERPINA1, HBD, ALDOA e FGG mostraram participar, simultaneamente, de diferentes processos biológicos identificados. Fenômenos de transporte celular, reparo tecidual, coagulação e resposta ao estresse, partilham de padrões de abundância semelhantes entre as proteínas identificadas.

Conclusões: Em comparação com a pele adjacente, no melasma foram identificadas proteínas, diferencialmente expressas, que participam de funções biológicas ligadas à glicólise, gliconeogênese, fenômenos de transporte celular, homeostasia, coagulação, reparo / cicatrização e resposta a estímulos externos.

Palavras-chave: Melasma, proteômica, melnose, proteínas, luz solar, raios ultra-violetas, melanócitos, pigmentação da pele, transtornos da pigmentação.

Abstract

Background: Melasma is an acquired common alteration in melanin pigmentation of the skin, characterized by generally symmetrical patches with irregular margins and defined limits. Although it has a high population frequency, its pathophysiology and the stimuli involved in melanocytic hypertrophy and focal hypermelanogenesis are not completely known. The proteomics study the set of proteins and their isoforms contained in a biological sample, be it a cell organelle, a cell, a tissue or an organism proper. The use of proteomic tools proposed in this work will aid in the exploration of the network of proteins differentially expressed on the skin with melasma and on the adjacent healthy skin, substantiating the elaboration of pathophysiological hypotheses for the disease.

Objective: : Differential identification of proteins expressed on the skin with melasma and on healthy adjacent skin.

Methods: After approval of the ethics committee, the study recruited 20 women over the age of 18, with facial melasma, without melasma treatment for more than 30 days, except sunscreen, followed at the HCPrudente dermatology outpatient clinic. Three biopsies were performed on each patient using a 3mm punch on the face , one in an area with melasma and one in adjacent healthy skin (40 skin fragments). The samples were frozen in liquid nitrogen, macerated, digested, and the proteins extracted after these processes were submitted to mass spectrometry.

Results: The mean age (standard deviation) of the patients was 42.8 (8.9) years, 45% were of type IV, 25% had professions exposed to the sun. The age at onset of melasma was 29.3 (7.5) years, 55% of the women reported family history and 30% used contraception. 256 proteins were identified in the samples. There was significant differential expression between topographies for 29 proteins (25 up regulated and 4 down regulated). ACTG1, ALB, SERPINA1, HBD, ALDOA e FG3 were shown to be involved in different biological processes. Cell transport phenomena, tissue repair, coagulation and stress response, share similar patterns of abundance among identified proteins.

Conclusions: Differentially expressed proteins were identified in the melasma, which participate in biological functions linked to glycolysis, gluconeogenesis, cellular transport phenomena, haemostasis, coagulation, repair / healing and response to external stimuli.

Keywords: Melasma, Proteomic, Melanose, Proteins, Sun Light, Ultraviolet Rays, Melanocytes, Skin Pigmentation, Pigmentary Disorders

Introdução

Melasma é uma hipermelanose focal, adquirida, crônica, comum, que acomete áreas fotoexpostas, principalmente de mulheres em idade fértil, e fototipos mais altos (III-V). Apesar de assintomático, devido à alta prevalência populacional, acometimento de áreas visíveis (como a face), especialmente de mulheres em idade fértil e pela refratariedade ao tratamento, melasma inflige importante impacto à qualidade de vida (Handel, 2014, Maranzatto 2016).

A fisiopatologia do melasma não é ainda totalmente compreendida, porém, parece diferir de outras discromias cutâneas adquiridas, como as efélides, lentigos e o bronzeamento devido à hipertrofia melanocítica, associada a alterações específicas na derme superior, como elastose solar, dano à zona de membrana basal e infiltrado de mastócitos (Lee, 2016; Miot, 2010).

Diversas investigações têm sido conduzidas na tentativa de elucidar as vias fisiopatológicas e as alterações presentes na pele do melasma a fim de idealizar tratamentos mais efetivos (Miot, 2009). É neste contexto que o estudo proteômico pode auxiliar na prospecção desses resultados, identificando a expressão diferencial de proteínas na pele com melasma e sã, visando o desenho mais detalhado da rede de sinalização que induz a pigmentação no melasma. Dessa forma, pode substanciar a elaboração de hipóteses fisiopatológicas para a doença.

A proteômica clínica estuda, a partir de uma amostra biológica, o conjunto de proteínas e suas isoformas resultantes do genoma e dos diversos fatores de regulação envolvidos, já que, muitas vezes, é impossível ser estudado o resultado funcional ou fenótipo resultante de um gene a partir da sequência do DNA, devido aos mecanismos de controle de sua expressão, *splicing* alternativo, formação de complexos, mecanismos de transporte, fatores pós-transcricionais, entre outros (Ghazalpour, 2011).

Este estudo objetiva a identificação da diferença entre as proteínas encontradas na pele com melasma e pele adjacente. Secundariamente, a avaliação das vias funcionais indicadas pelas proteínas expressas diferencialmente, além da avaliação das interações entre elas.

Métodos

POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram incluídas 20 mulheres, maiores de 18 anos, com diagnóstico clínico de melasma facial.

Critérios de exclusão foram uso de tratamento específico para o melasma (exceto filtro solar) há menos de 30 dias da inclusão.

As participantes foram selecionadas entre os atendidos no ambulatório de Cosmiatria do Serviço de Dermatologia do Hospital Regional de Presidente Prudente (HRPP), entre janeiro e abril/2017, desde que concordassem em participar do estudo. As amostras foram obtidas no HRPP e posteriormente levadas para o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Unesp - Botucatu para o desenvolvimento do estudo.

O projeto foi aprovado no comitê de ética institucional (CAAEE: 51108115530015515) e todas as participantes foram incluídas após assinatura do termo de consentimento (Anexos 1 e 2).

DESENHO DO ESTUDO

Estudo tipo transversal. Após questionário de informações clínicas e demográficas (Anexo 3), foram realizadas duas biópsias com *punch* 3mm na face (aproximadamente 5mm de profundidade, abrangendo epiderme e derme, não atingindo tecido celular subcutâneo) de cada paciente, sendo uma em região com melasma e outra na área com pele sã adjacente a menos de 2cm de distância (40 fragmentos de pele). Os fragmentos foram acondicionados em tubos Eppendorf secos, e armazenados em nitrogênio líquido até seu processamento.

PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Após a realização das biópsias, os processos subsequentes envolveram a extração mecânica das proteínas, a digestão enzimática das mesmas e a espectrometria de massas.

Etapa 1: extração mecânica de proteínas

Transferiram-se as biópsias de tubos Eppendorf para tubetes Cryovial®. Nos tubetes, foi adicionado 500µL para cada amostra de solução preparada com 50mM de bicarbonato de amônio contendo 2% (m/v) de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate). Para obter esta solução foi adicionado 1g de CHAPS e 0,197g de bicarbonato de amônio a água Milli-Q® até completar 50 mL finais.

Os tubetes contendo as amostras e a solução foram submetidos à homogeneização com o dispersor T 25 digital Ultra-turrax® da seguinte maneira: dois ciclos de 20s no dispersor, com descanso de 1min entre eles seguidos de pausa de uma hora, e novos três ciclos.

Ao término, as amostras foram homogeneizadas em gelo, submetidas a banho ultrassônico por 10s e transferidas para tubos Eppendorf para centrifugação. A centrifugação foi realizada com 16.000 g por 10min. Posteriormente, o sobrenadante foi pipetado para um novo Eppendorf para ser quantificado e digerido.

Etapa 2: Quantificação proteica

As proteínas presentes no exsudato foram então quantificadas em triplicata pelo método de Bradford (BioRad®;Protein Assay, cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão (Apêndice 1). Após esse procedimento, as amostras foram transferidas para novos tubos plásticos LoBind (Eppendorf®) e diluídas em NaCl a 0,9% (m/v) para serem padronizadas quanto a sua concentração, estabelecendo-se a relação 50µg/40µL para cada amostra.

Etapa 3: Digestão proteica em solução

As amostras foram digeridas em solução iniciando-se pelas etapas de redução e alquilação, utilizando ditioneitol (DTT) 10mM e iodoacetamida (IAA) 45mM, ambos solubilizados em solução de bicarbonato de amônio 50mM. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica na presença da enzima tripsina na concentração 1:50 (enzima:substrato), solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu por 18h, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. Estas foram então dessalinizadas utilizando-se cartuchos Sep Pak Vac C18 (Waters). As amostras digeridas e dessalinizadas foram reduzidas em SpeedVac™ (Thermo Scientific) e mantidas a 4°C até o momento da análise por espectrometria de massas.

Etapa 4: Espectrometria de Massas

A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas (MS) Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85% de fase móvel B durante 70min com fluxo de 0,35µL/min e a temperatura da coluna

mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 75min.

Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milliford, USA). As amostras foram submetidas ao MS em duplicatas. A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Homo sapiens* do catálogo do UniProt (*Universal Protein Resource*) em agosto de 2017.

QUANTIFICAÇÃO LIVRE DE MARCADORES (*label-free*)

Todas as proteínas identificadas com escore de confiança >95% foram incluídas na análise quantitativa. As intensidades de picos iônicos de cada proteína foram normalizadas, escalonadas e comparadas entre as topografias pelo software PLGS versão 3.03 (Waters, Milliford, USA) a partir de um algoritmo Bayesiano (método de Monte Carlo), que retorna um p-valor bidirecional: $\leq 0,05$ para as proteínas sub-reguladas, e $\geq 0,95$, para as super-reguladas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis categóricas foram representadas pelo seu percentual, e as quantitativas, pela média e desvio-padrão ou mediana e quartis (p25-p75), se a normalidade não fosse evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk (Miot, 2017).

O desfecho principal do estudo foi a identificação do diferencial entre as intensidades de picos de íons das proteínas identificadas entre as topografias cutâneas (melasma: M, pele perilesional: P). A dimensão do efeito foi estimada a partir da relação dessas quantidades relativas entre as topografias: Razão M/P.

Os p-valores foram corrigidos pelo procedimento de Benjamini-Hochberg para redução da taxa de falsa descoberta (FDR – *False Discovery Rate*) (Benjamini, 1995).

A razão das intensidades das proteínas identificadas entre as topografias (M/P), ponderada pelo p-valor corrigido (FDR) foi expressa pelo diagrama “S-plot” Foram considerados de significância clínica as proteínas com razão M/P $\leq 0,5$ ou $\geq 2,0$, desde que o FDR seja $\leq 0,05$ ou $\geq 0,95$.

As proteínas que se mostraram significativas foram submetidas à análise de interação pelo software STRING (<https://string-db.org>), identificados agrupamentos funcionais e rede de até 10 interações a partir de média significância ($r > 0,4$).

Proteínas que demonstraram abundância diferencial significativa e as funções biológicas que estão envolvidas foram diagramadas em um mapa térmico, cujos *clusters* foram estimados a partir das distâncias euclidianas sob algoritmo de agrupamento de Ward.

Resultados

Os principais dados clínicos e demográficos das participantes estão listados na tabela 1. Destacam-se mulheres em idade fértil, com fototipo IV, que viveram em ambiente rural ou praia e com histórico familiar de melasma. O local de acometimento mais prevalente foi a região zigomática e o padrão centrofacial se sobressaiu em relação a outros fenótipos.

Tabela 1. Principais características clínicas e demográficas de mulheres com melasma facial (n=20).

Variável	Resultado
Idade (anos)*	42,8 (8,9)
Fototipo#	
	II 2 (10)
	III 5 (25)
	IV 9 (45)
	V 4 (20)
Morou na praia / rural#	9 (45)
Profissão exposta ao sol#	5 (25)
Histórico de Tabagismo#	4 (20)
Idade de Início (anos)*	29,3 (7,5)
História Familiar#	11 (55)
Uso ACO#	6 (30)
Gestações**	2 (1-3)
Fator Desencadeante#	
	Exposição ao sol 10 (50)
	Gestação 8 (40)
	Contraceptivo oral 4 (25)
	Outro 1 (5)
Forma clínica#	
	Centrofacial 10 (50)
	Misto 7 (35)
	Periférico 3 (15)
Topografia afetada#	
	Zigoma 16 (80)
	Frontal 16 (80)
	Nasal 7 (35)
	Mandibular 7 (35)
	Mento 6 (30)
	Temporal 6 (30)
	Parótida 5 (25)
	Glabela 5 (25)
	Labial superior 4 (20)

n (%), * média (desvio-padrão); ** mediana (p25-p75);

Foram identificadas 256 diferentes proteínas e isoformas dos fragmentos de pele oriundos dos participantes (Apêndice 2). A Figura 1 (S-plot) representa a dispersão entre as razões M/P e a significância corrigida (FDR) entre as topografias (Apêndice 3). A Tabela 2 lista os 29 grupos dentre 58 sequências de proteínas que apresentaram diferença significativas e razão M/P ≥ 2 , ou $\leq 0,5$.

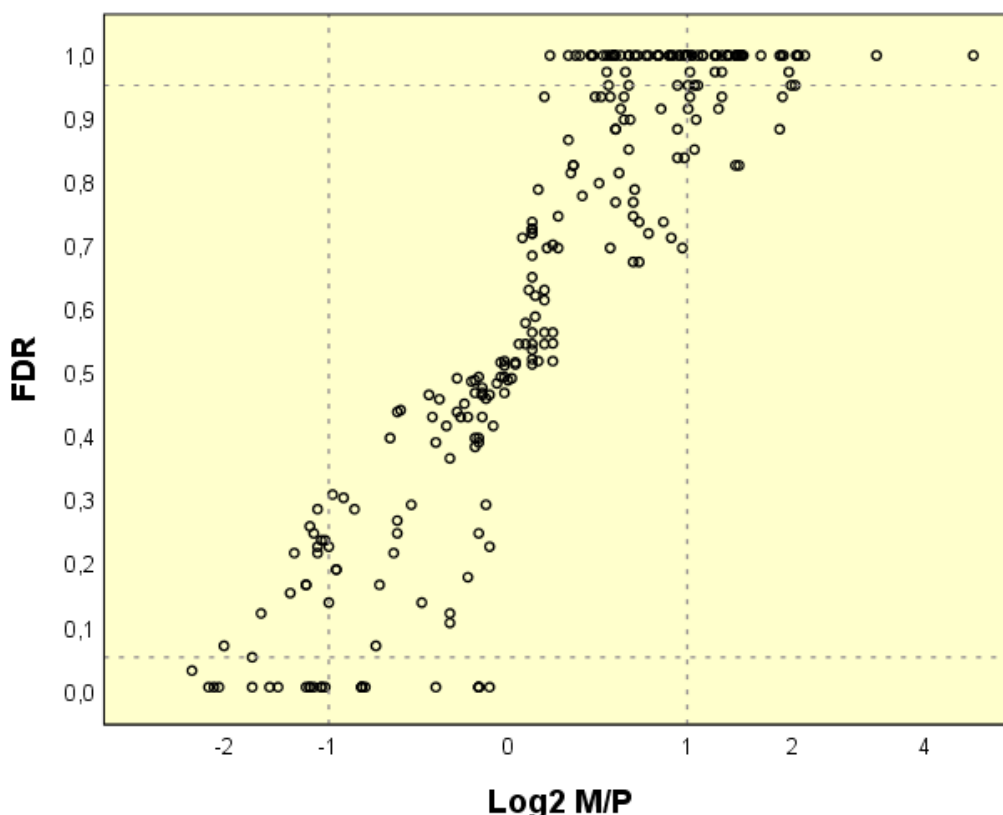


Figura 1. Diagrama em “S” (S-plot) das 256 proteínas e isoformas identificadas e a razão entre a pele com melasma e perilesional (M/P). P-valor corrigido para o *False Discovery Rate* (FDR) pelo procedimento de Benjamini-Hochberg. No quadrante superior direito estão as proteínas super-reguladas (M/P >2 e FRD > 0,95) e no quadrante inferior esquerdo estão as proteínas sub-reguladas (M/P < 0,5 e FDR < 0,05).

Com base nas proteínas indicadas na Tabela 2, identificaram-se quatro principais agrupamentos quanto as suas funções biológicas (Figura 3). Um grupo que envolve as subunidades de hemoglobina e a anidrase carbônica, outro grupo que engloba albumina, alfa-1-antitripsina, ceruloplasmina, aldolase e fibrinogênio; outro de proteínas de transporte e citoesqueleto; além de um grupo ligado à síntese e reparo do DNA.

Tabela 2. Proteínas e isoformas identificadas nas amostras de peles de melasma facial e adjacente fotoexposta (n=40) com diferença ente os grupos ($p \leq 0,05$ ou $\geq 0,95$) e Razão M/P $\geq 2,0$ ou $\leq 0,5$.

Código Proteínas	Proteína	Escore PLGS	Melasma	Perilesional	Log2 M/P (dp)	Razão M/P	p-valor*
P1	Actin_alpha skeletal muscle ACTA1	958,81	1,34 (0,04)	0,66 (0,04)	1,04 (0,07)	2,05	1,00
	Actin_cytoplasmic 2 ACTG1	1164,96	1,40 (0,06)	0,60 (0,06)	1,23 (0,11)	2,34	1,00
P2	Actin_cytoplasmic 2 ACTG1	1164,96	1,40 (0,07)	0,60 (0,07)	1,24 (0,12)	2,36	1,00
P3	A-kinase anchor protein 13 AKAP13	87,85	1,53 (0,40)	0,47 (0,40)	1,96 (1,03)	3,90	0,97
	A-kinase anchor protein 13 AKAP13	87,85	1,55 (0,37)	0,45 (0,37)	1,99 (1,13)	3,97	0,95
P4	A-kinase anchor protein 9 AKAP9	12,43	0,35 (0,34)	1,65 (0,34)	-2,39 (1,00)	0,19	0,03
	A-kinase anchor protein 9 AKAP9	13,08	0,38 (0,20)	1,62 (0,20)	-2,16 (0,50)	0,22	0,00
	A-kinase anchor protein 9 AKAP9	16,30	0,40 (0,24)	1,60 (0,24)	-2,06 (0,55)	0,24	0,00
P5	Albumin_isoform CRA_k ALB	542,99	0,62 (0,05)	1,38 (0,05)	-1,14 (0,08)	0,45	0,00
	Serum albumin ALB	5862,44	0,54 (0,18)	1,46 (0,18)	-1,44 (0,32)	0,37	0,00
	Serum albumin ALB	542,99	0,63 (0,04)	1,37 (0,04)	-1,14 (0,07)	0,45	0,00
	Serum albumin ALB	542,99	0,52 (0,07)	1,48 (0,07)	-1,50 (0,12)	0,35	0,00
	Serum albumin ALB	2923,53	0,62 (0,10)	1,38 (0,10)	-1,17 (0,17)	0,44	0,00
	Serum albumin ALB	542,99	0,63 (0,06)	1,37 (0,06)	-1,11 (0,10)	0,46	0,00
	Serum albumin ALB	486,61	0,64 (0,06)	1,36 (0,06)	-1,07 (0,09)	0,48	0,00
P6	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	1092,60	1,33 (0,13)	0,67 (0,13)	1,00 (0,21)	2,00	1,00
	Androglobin ADGB	69,19	0,48 (0,21)	1,52 (0,21)	-1,69 (0,40)	0,31	0,05
P8	Annexin ANXA2	117,73	1,33 (0,25)	0,67 (0,25)	1,01 (0,41)	2,01	0,95
	Annexin ANXA2	117,73	1,33 (0,26)	0,67 (0,26)	1,02 (0,44)	2,03	0,97
	Annexin ANXA2	117,73	1,34 (0,26)	0,66 (0,26)	1,05 (0,43)	2,08	0,95
	Annexin ANXA2	117,73	1,35 (0,28)	0,65 (0,28)	1,08 (0,43)	2,12	0,95
P9	Beta-actin-like protein 2 ACTBL2	101,00	1,43 (0,07)	0,57 (0,07)	1,34 (0,12)	2,53	1,00
P10	BTB/POZ domain-containing protein KCTD7	53,81	1,57 (0,17)	0,43 (0,17)	1,90 (0,40)	3,74	1,00
P11	Carbonic anhydrase 1 CA1	1112,39	0,39 (0,17)	1,61 (0,17)	-2,09 (0,45)	0,23	0,00
	Carbonic anhydrase 1 CA1	1386,45	0,47 (0,13)	1,53 (0,13)	-1,70 (0,27)	0,31	0,00
P12	Ceruloplasmin CP	76,55	1,40 (0,17)	0,60 (0,17)	1,23 (0,30)	2,34	1,00
	Ceruloplasmin CP	85,85	1,37 (0,17)	0,63 (0,17)	1,13 (0,29)	2,18	1,00
	Ceruloplasmin CP	85,85	1,43 (0,15)	0,57 (0,15)	1,34 (0,27)	2,53	1,00
P13	DNA polymerase zeta catalytic subunit REV3L	73,85	1,58 (0,34)	0,42 (0,34)	2,03 (0,86)	4,10	0,95
	DNA polymerase zeta catalytic subunit REV3L	153,25	1,52 (0,06)	0,48 (0,06)	1,66 (0,12)	3,16	1,00
P14	Exophilin-5 EXPH5	40,12	1,79 (0,12)	0,21 (0,12)	3,16 (0,48)	8,94	1,00
P15	Fibrinogen gamma chain FGG	211,06	1,33 (0,16)	0,67 (0,16)	1,01 (0,25)	2,01	1,00
	Fibrinogen gamma chain FGG	211,06	1,34 (0,14)	0,66 (0,14)	1,04 (0,24)	2,05	1,00
P16	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	153,06	1,45 (0,09)	0,55 (0,09)	1,41 (0,16)	2,66	1,00
	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	153,06	1,46 (0,07)	0,54 (0,07)	1,43 (0,14)	2,69	1,00
	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	296,85	1,45 (0,07)	0,55 (0,07)	1,41 (0,13)	2,66	1,00
	Fructose-bisphosphate aldolase ALDOA	295,30	1,46 (0,10)	0,54 (0,10)	1,43 (0,17)	2,69	1,00
	Fructose-bisphosphate aldolase ALDOA	295,30	1,47 (0,08)	0,53 (0,08)	1,46 (0,14)	2,75	1,00
P17	G patch domain-containing protein 1 GPATCH1	95,48	1,37 (0,14)	0,63 (0,14)	1,13 (0,25)	2,18	1,00

	G patch domain-containing protein 1 GPATCH1	88,85	1,60 (0,28)	0,40 (0,28)	2,15 (0,66)	4,44	1,00
P18	Heat shock protein 75 kDa_ mitochondrial TRAP1	124,78	1,43 (0,13)	0,57 (0,13)	1,34 (0,24)	2,53	1,00
P19	Hemoglobin subunit alpha HBA1	8552,23	1,57 (0,02)	0,43 (0,02)	1,88 (0,04)	3,67	1,00
P20	Hemoglobin subunit beta HBB	91,85	0,65 (0,05)	1,35 (0,05)	-1,07 (0,08)	0,48	0,00
P21	Hemoglobin subunit delta HBD	42,06	1,94 (0,02)	0,06 (0,02)	5,05 (0,31)	33,12	1,00
P22	Keratin_ type I cytoskeletal 9 KRT9	340,12	1,61 (0,13)	0,39 (0,13)	2,05 (0,27)	4,14	1,00
	Keratin_ type I cytoskeletal 9 KRT9	190,36	1,60 (0,26)	0,40 (0,26)	2,06 (0,62)	4,18	1,00
P23	Keratin_ type II cytoskeletal 1 KRT1	55,74	1,62 (0,06)	0,38 (0,06)	2,08 (0,14)	4,22	1,00
P24	POTE ankyrin domain family member F POTEF	101,00	1,47 (0,07)	0,53 (0,07)	1,49 (0,14)	2,80	1,00
P25	Putative beta-actin-like protein 3 POTEKP	101,00	1,47 (0,09)	0,53 (0,09)	1,47 (0,16)	2,77	1,00
P26	RNA-binding protein 25 RBM25	29,17	1,57 (0,12)	0,43 (0,12)	1,86 (0,25)	3,63	1,00
P27	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1 SREK1	79,89	1,41 (0,26)	0,59 (0,26)	1,28 (0,48)	2,44	1,00
P28	Tetratricopeptide repeat protein 37 TTC37	443,53	1,45 (0,21)	0,55 (0,21)	1,44 (0,42)	2,72	1,00
	Tetratricopeptide repeat protein 37 TTC37	449,05	1,46 (0,18)	0,54 (0,18)	1,47 (0,36)	2,77	1,00
	Triosephosphate isomerase TPI1	475,34	1,39 (0,25)	0,61 (0,25)	1,23 (0,41)	2,34	0,97
P29	Triosephosphate isomerase TPI1	475,34	1,41 (0,22)	0,59 (0,22)	1,28 (0,40)	2,44	0,97
	Triosephosphate isomerase TPI1	576,90	1,43 (0,19)	0,57 (0,19)	1,34 (0,37)	2,53	1,00

*p-valor corrigido pelo *false discovery rate*

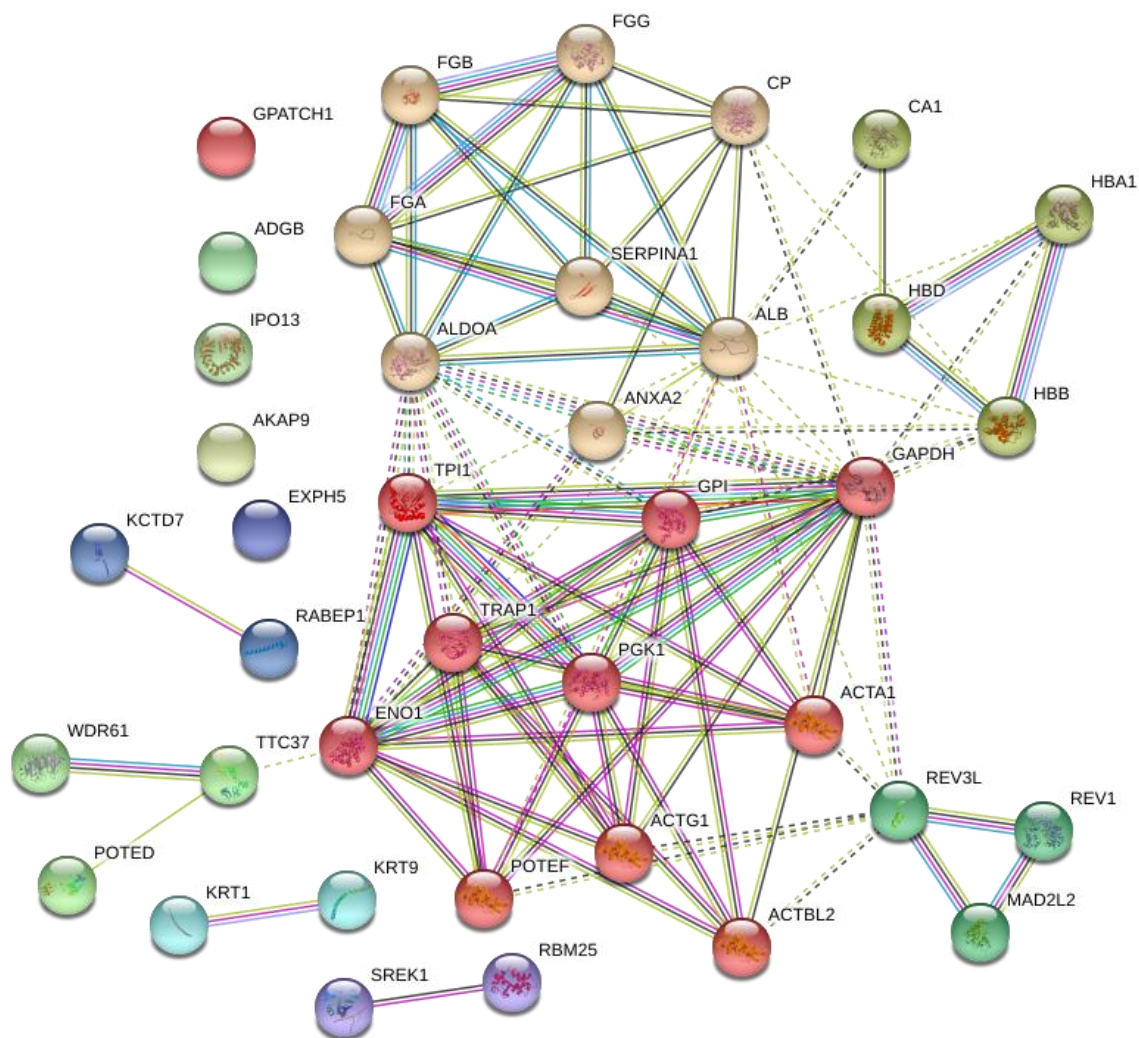


Figura 2. Agrupamentos de interação das proteínas identificadas como diferenciais na comparação da pele com melasma e perilesional .

A Tabela 3 indica as funções biológicas que essas proteínas exercem, de acordo com um FDR $\leq 0,01$, assim como o número de proteínas envolvidas em cada processo, dentre as identificadas. Com um maior número de proteínas envolvidas, destacam-se funções que indicam aumento do metabolismo basal, ligadas à homeostasia, reparo, transporte celular e resposta a estímulos.

A figura 3 representa graficamente a interação entre as proteínas e suas funções. As proteínas ACTG1, ALB, SERPINA1, HBD, ALDOA e FGG apresentam-se como coparticipantes em diferentes processos biológicos. Além das funções fenômenos de transporte, reparo tecidual, coagulação e resposta ao estresse, partilham de padrões de abundância semelhantes entre as proteínas.

TABELA 3. Principais vias funcionais envolvidas com as 29 proteínas identificadas como diferenciais entre melasma e pele perilesional.

Funções	Proteínas envolvidas	N (%)	FDR*
1. Glicólise canônica	p16,p29	2 (7)	<0,0001
2. Gluconeogênese	p16,p29	2 (7)	<0,0001
3. Fibrinólise	p8,p15,p23	2 (10)	<0,0001
4. Degranulação plaquetária	p2,p5,p6,p15,p16	5 (17)	<0,0001
5. Regulação de fluídos corporais	p2,p5,p6,p8,p15,p16,p21,p23	8 (28)	<0,0001
6. Transporte de oxigênio	p7,p19,p20,p21	4 (14)	<0,0001
7. Transporte mediado por vesículas	p2,p5,p6,p10,p14,p15,p16,p19,p20	9 (31)	<0,0001
8. Ativação plaquetária	p5,p6,p15,p16	4 (14)	<0,0001
9. Regulação positiva da adesão celular	p15	1 (3)	0,0001
10. Hemostasia	p2,p5,p6,p15,p16,p21	6 (20)	0,0001
11. Agregação plaquetária	p2,p15	2 (7)	0,0002
12. Ativação do plasminogênio	p15	1 (3)	0,0003
13. Transporte de organismo único	p2,p5,p6,p7,p8,p10,p11,p12,p14,p15, p16,p19,p20,p21	14 (48)	0,0004
14. Coagulação sanguínea	p2,p5,p6,p15,p16,p21	6 (21)	0,0008
15. Síntese de translesão propensa a erros	p13	1 (3)	0,0010
16. Cascata de ativação de proteínas	p15,p23	2 (7)	0,0014
17. Homeostase da retina	p2,p5,p23,p24	4 (14)	0,0015
18. Regulação negativa de resposta a trauma	p8,p10,p15	3 (10)	0,0015
19. Regulação positiva da exocitose	p14,p15	2 (7)	0,0016
20. Regulação da exocitose	p10,p14,p15	3 (10)	0,0017
21. Regulação negativa do processo endotelial de apoptose celular	p15	1 (3)	0,0022
22. Coagulação sanguínea, formação de coágulo de fibrina	p15	1 (3)	0,0024
23. Regulação negativa da via de sinalização da apoptose extrínseca através da morte de receptores de domínio	p15	1 (3)	0,0024
24. Transporte	p2,p4,p5,p6,p7,p10,p11,p12,p15,p16, p19,p20,p21	13 (45)	0,0029
25. Processo Metabólico do ácido monocarboxílico	p5,p16,p29	3 (10)	0,0030
26. Regulação da disseminação de células dependentes da adesão	p15	1 (3)	0,0033
27. Cicatrização de feridas	p2,p5,p6,p15,p16,p21	6 (20)	0,0035
28. Transporte de bicarbonato	p11,p19,p20	3 (10)	0,0044
29. Regulação positiva da vasoconstrição	p15	1 (3)	0,0044
30. Resposta ao íon cálcio	p2	1 (3)	0,0075
31. Regulação do transporte por vesículas	p8,p10,p14,p15	4 (14)	0,0083
32. Secreção	p5,p6,p8,p15,p16	5 (17)	0,0092
33. Regulação negativa a estímulos externos	p8,p10,p15	3 (10)	0,0098
34. Resposta ao Estresse	p2,p5,p6,p13,p16,p19,p20,p21,p23	9 (31)	0,0100

*False discovery rate estimado de acordo com o número de proteínas esperadas para a função.

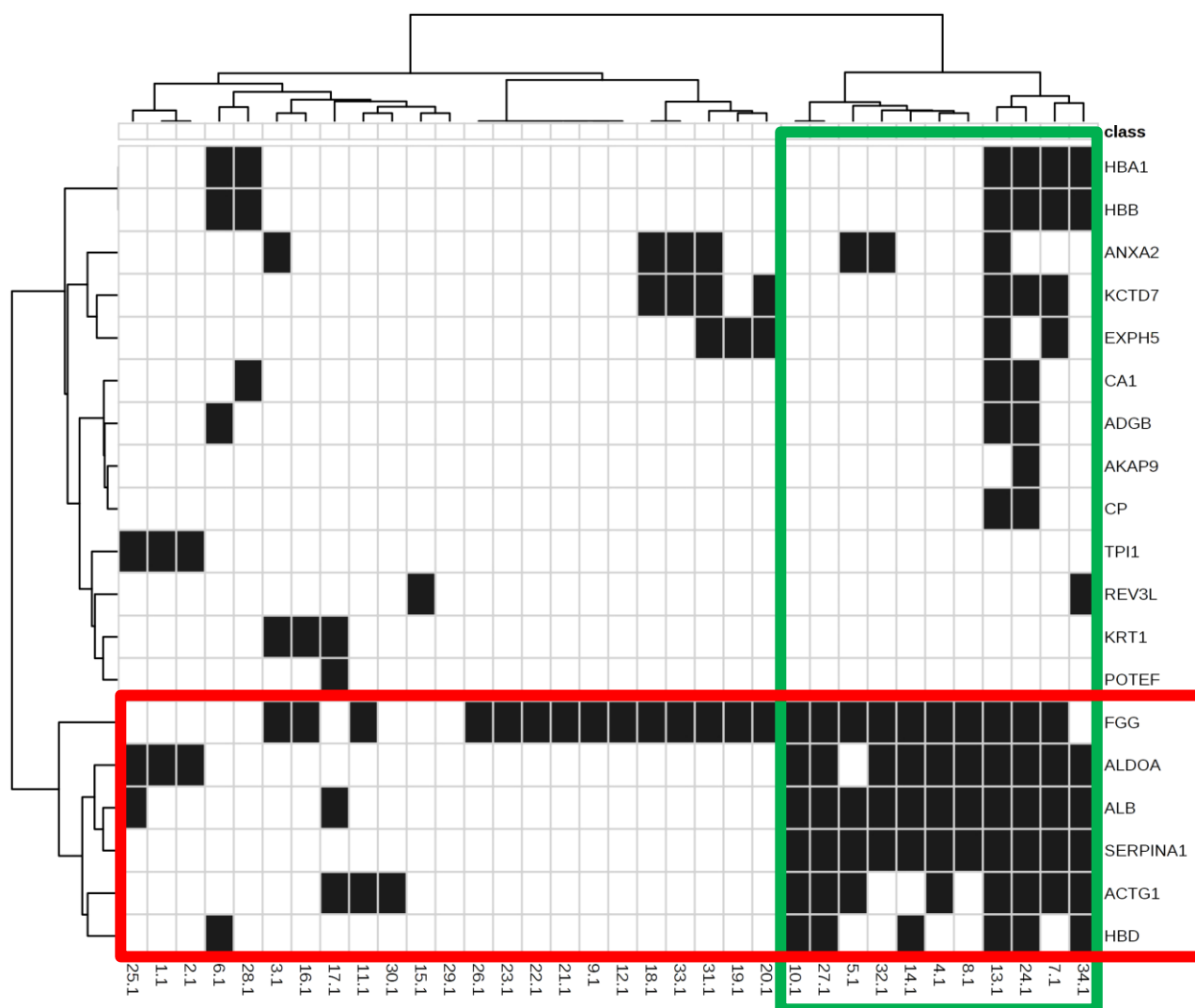


Figura 3. Mapa térmico e dendrogramas entre proteínas identificadas (linhas) e funções biológicas (colunas). Destaques em vermelho: agrupamento de proteínas com padrão de ocorrência semelhante de acordo com as funções que exercem; e em verde: as funções com padrão de abundância semelhante de acordo com as proteínas indicadas.

Discussão

Este estudo preliminar identificou 29 grupos diferenciais de proteínas entre a pele com melasma e pele adjacente, e a análise de interação entre elas sugeriu 34 funções biológicas principalmente envolvidas, sugerindo que a fisiopatologia do melasma envolva a diferentes vias funcionais, o que fortalece a individualização do melasma quanto ao processo de melanogênese.

A identificação de proteínas envolvidas no consumo de oxigênio, glicólise, gliconeogênese e fenômenos de transporte celular, indicam maior processo metabólico na pele com melasma. A hiper melanogênese e maior atividade citocrínica de melanossomos na epiderme com melasma são

processos que demandam consumo de ATP pelo melanócito, que se encontra hipertrofiado com proeminência dos dendritos e de organelas celulares. Ademais, os queratinócitos adjacentes também expressam alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas, além de serem secretores ativos de α MSH, o principal indutor da melanogênese (Brianezi 2015; Miot 2010; Videira, 2013).

Aldolase A (ALDOA), especialmente aumentada no melasma, tem função glicolítica e ligada à atividade dos mastócitos, especialmente presentes na derme superficial e que promovem alterações na ZMB, elastose solar e dilatação endotelial (Hernández- Barrera, 2008; Lee, 2015). Esses elementos reforçam o conceito que estímulos dérmicos exerçam papel na melanogênese do melasma (Davis, 2010).

Treze das proteínas identificadas diferencialmente, na pele com melasma eram ligadas a fenômenos de transporte. O transporte intracelular compreende uma série de processos que vão, desde a endocitose, autofagia e diferentes formas de exocitose. À microscopia eletrônica, há proeminência de organelas e vesículas no citoplasma, tanto de queratinócitos, como de melanócitos, além dos eumelanossomas maduros. Desde que processos como a autofagia e senescência possam estar relacionados à melanogênese, a caracterização das vesículas de transporte no epitélio com melasma precisa ser explorada (Miot, 2010; Setaluri, 2015).

O processo de transferência dos melanossomas para os queratinócitos é um fenômeno de transporte que ainda não é bem esclarecido. Envolve a fusão de membranas plasmáticas, a liberação de melanossoma no espaço extracelular, com conseqüente captação por fagocitose pelo queratinócitos, a citofagocitose de dendritos, transferência de vesículas e a “apocopação” (liberação de um pedaço da célula) como possíveis mecanismos (Park, 2009; Zbytec, 2013) .

Apesar do principal fenótipo clínico do melasma ser a hiperpigmentação melânica, ocorrem diversas alterações subjacentes à epiderme, que podem estar relacionadas à sinalização para a melanogênese. Na derme superficial, acontece maior elastose, degeneração do colágeno, dano à ZMB, a microvasculatura apresenta vasos mais tortuosos e dilatados (Lee, 2015; Gilcrest, 1996).

Nosso estudo identificou proteínas ligadas ao reparo e cicatrização. Provavelmente pela ação do dano solar causado por RUV, há infiltrado de mastócitos, aumento da produção de citocinas melanogênicas e metaloproteinases (MMP) a partir dos fibroblastos dérmicos, além da promoção de óxido nítrico sintase induzida e maior estresse oxidativo local (Lee, 2015).

Identificaram-se níveis de alfa 1 anti-tripsina (SERPINA 1) aumentados na pele com melasma. Uma hipótese para isso é a contra-regulação da atividade de MMP9, uma das metaloproteinases

responsáveis pela fragmentação do colágeno, elastose solar, irregularidades na membrana basal e diminuição da síntese de colágeno tipo 1 (Torres-Álvarez, 2011; Reiss, 2009).

Actina gama-1 (ACTG) é uma proteína estrutural, considerada como um componente da maquinaria da migração celular, essencial para o rearranjo das redes dinâmicas do citoesqueleto (Dong, 2017). Seu aumento no melasma pode indicar processo de proliferação e migração celular, participando dos processos de reparo dérmico que envolvem a fisiopatologia do melasma (Lee, 2015).

Dermabrasão delicada (micromotor) foi descrito com sucesso no melasma, levando à melhora sustentada de 97% de 410 pacientes tailandeses sugerindo que o reparo e neocolagênese da derme superficial possa auxiliar no sucesso da terapêutica (Kunachak, 2001). Outra técnica descrita é o microagulhamento (Lima, 2015), que promove a proliferação de fibroblastos e a colagênese da derme superior. Esses procedimentos podem restaurar o dano da ZMB e da derme superior, desfavorecendo o contato de melanócitos com estímulos melanogênicos liberados por via dérmica como endotelina, fator de células-tronco e fator de crescimento de hepatócitos (Lima, 2017).

Este estudo identificou também proteínas relacionadas ao processo de coagulação, hemostasia, fibrinólise e degradação plaquetária.

Fibrinogênio (FGG) é uma proteína que interage em diversas funções biológicas, dentre elas a angiogênese e cicatrização de feridas. As células epidérmicas são capazes de usar o fibrinogênio como substrato para a migração celular no processo de cicatrização (Donaldson, 1989). Além disso, o fibrinogênio medeia a agregação plaquetária, elemento primário do processo de reparo (Farrel, 1992; Mendonça, 2009).

Estas considerações podem estar relacionadas com o sucesso terapêutico do ácido tranexâmico, utilizado como hemostático pelo aumento da agregação plaquetária (Zhou, 2017). Seu efeito no tratamento do melasma pode também decorrer da sua atividade antiplasmina, já que níveis elevados de plasmina nos queratinócitos induzem a síntese de ácido araquidônico e o aumento de α MSH (Maeda, 2007). Em ensaio clínico randomizado duplo-cego com 44 pacientes, ácido tranexâmico (AT) oral por três meses promoveu redução de 49% no escore mMASI, em comparação com 19% do placebo (Del Rosario, 2017).

A análise proteômica mostrou maior expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo nas áreas com melasma. A RUV, especialmente UVA, é capaz de induzir a produção de citocinas melanogênicas – tais como fator de crescimento de hepatócitos, fator estimulador de *stem cell* (SFC) e metaloproteinases (MMP) diretamente a partir dos fibroblastos dérmicos, além da promoção de óxido

nítrico sintase induzida e estresse oxidativo local (Lee, 2015). Ademais, pacientes com melasma apresentam maiores níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA), superóxido dismutase e glutathione (GSH) comparado a controles, sendo os níveis de MDA correlacionados ($r=0,31$) ao escore MASI (Choubey, 2017).

Hemoglobina é a maior proteína envolvida no transporte de oxigênio. É composta pela subunidade Hb- α e Hb- β , que estão normalmente expressas pelas células da linhagem eritroide. Entretanto, recentemente tem-se pesquisado a síntese de hemoglobina pelas células não eritróides (Saha, 2017). Este mecanismo acontece de forma não balanceada e está relacionada a mecanismos de estresse celular (Saha, 2014). Na pele com melasma houve maior expressão de HBD, que pode estar relacionado com o maior estresse oxidativo envolvido na patogênese do melasma.

Embora o melasma apresente proliferação endotelial e o processo de coleta de amostras da pele envolva sangramento, o fato de apenas os tipos de hemoglobina A e D estarem aumentados, enquanto o tipo B está diminuído, favorece que tal aumento se deva à produção local e não decorra do sangramento pelo procedimento.

Da mesma forma que a hemoglobina, as proteínas ACTG1 e alfa-1-antitripsina já citadas anteriormente também estão relacionadas à resposta ao estresse. Nesse contexto, já que a melatonina apresenta importante efeito antioxidante, um estudo duplo-cego avaliou, em 36 pacientes com melasma, os possíveis efeitos de creme de melatonina formulado topicamente sozinho ou em combinação com protetor solar e melatonina oral em comparação com a hidroquinona. Para avaliar o estado de estresse oxidativo, os níveis de MDA e GSH no plasma foram mensurados antes do início do tratamento e após 45, 90 e 120 dias. No final do período de tratamento, todos os pacientes com melasma demonstraram redução significativa no escore de MASI e dos níveis de MDA e GSH. A taxa de redução do MASI se correlacionou ($r=0,78$) com a redução do MDA no grupo que utilizou melatonina oral (Hamadi, 2009).

O picnogenol também foi avaliado como terapêutica antioxidante para o melasma. As procianidinas do picnogenol são capazes de suprimir espécies reativas de oxigênio (ROS) e possuem forte atividade antitirozinase, levando à supressão da biossíntese da melanina, corroborando seu potencial antimelanogênico (Scharf, 2015). Seu poder antioxidante foi avaliado por meio da supressão da atividade de peroxinitrilo, superóxido, óxido nítrico e radical hidroxila, ocorrendo também regulação positiva na proporção glutathione reduzida / glutathione oxidada nas células B16 (Kim, 2008).

Um estudo duplo-cego controlado tipo *crossover* com 30 mulheres, na Malásia, demonstrou que o consumo de procianidinas (80mg/dia), durante 30 dias, gerou melhora significativa das manchas

(Shahrir, 2004). Outro estudo controlado com 60 pacientes Filipinas, utilizou comprimidos contendo 24mg de procianidina, 6 mg de beta-caroteno, 60 mg de ácido ascórbico e 15 UI de Vitamina E em duas doses diárias no tratamento de melasma malar, por oito semanas. Houve redução do MASI de 11 a 32% a partir da quarta semana de uso. (Handog, 2009).

O presente estudo apresenta potenciais limitações ligadas ao tamanho amostral modesto. Entretanto, a possibilidade de comparação intrasujeito e a grande sensibilidade da MS favoreceram a identificação de um grande número de proteínas diferenciais entre as topografias. Ademais, o uso simultâneo da correção para FDR e o emprego de uma razão ≥ 2 ou $\leq 0,5$ foram estratégias robustas para aumentar a fidedignidade dos achados (McCarthy, 2009; Dalman, 2012).

Apesar do emprego de sujeitos de um único centro, com padrões de fototipo, idade e sexo semelhantes, a representatividade dessa amostra de acordo com a epidemiologia brasileira (Tamega, 2013) garantiu a homogeneidade do grupo e a validade interna dos achados, mas que não devem ser generalizados, diretamente, para outros grupos populacionais, homens ou melasma extrafacial.

Finalmente, a pele humana apresenta grande quantidade de lipídios, epitélio estratificado com ancoragem intercelular, proteínas com altos níveis de *cross-link* (p.ex. colágeno), proteínas transmembranas ou envoltas em estruturas complexas de organelas e antiproteases nativas que reduzem a eficácia da tripsinização na clivagem proteica e a solubilização dos fragmentos identificáveis de proteínas. Estudos que empregaram metodologia similar, identificaram número de proteínas semelhantes, e o desenvolvimento de técnicas de processamento próprias para tecidos com tal grau de complexidade e EM com maior sensibilidade, devem multiplicar a identificação de proteínas e alavancar a proteômica clínica em dermatologia (Bliss, 2016; Mikesh, 2013).

A melanogênese é um processo complexo, presente em animais com função de pigmentação constitutiva e resposta a processos inflamatórios. A pigmentação induzida por radiação ultravioleta se desenvolveu na espécie humana devido a diversas pressões seletivas, após a perda dos pelos corporais e o processo de migração (Sulaimon SS, 2003; Videira IF, 2013; Jablonski, 2013). Entretanto, o melasma parece ser um modelo fisiopatológico que difere do bronzeamento e de outras doenças pigmentares adquiridas como a hiperpigmentação pós-inflamatória, eritema *ab igne*, urticária pigmentosa, lentigos solares, efélides, ocronose e fitofotodermatite (Lee, 2015; Patel, 2013).

Conquanto não se disponha de modelos animais de melasma, a interferência farmacológica nas diversas vias identificadas neste estudo deve ser testada em culturas organoides de pele, ou mesmo em estudos clínicos, a fim de contribuir no tratamento ou na remissão da doença.

Referências

- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methods)*. 1995; 57 (1): 289-300.
- Bliss E, et al. An optimised method for the proteomic profiling of full thickness human skin. *Biol Proced Online*. 2016; 21(18):15.
- Brianezi G, et al. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015; 29(4): 809-12.
- Choubey V, et al. Role of oxidative stress in melasma: a prospective study on serum and blood markers of oxidative stress in melasma patients. *Int J Dermatol*. 2017; 56(9): 939-43.
- Dalman MR, et al. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13(2): S11.
- Del Rosario E, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind study of oral tranexamic acid in the treatment of moderate to severe melasma. *J Am Acad Dermatol*. 2017 (ahead of print).
- Donaldson DJ, et al. Fibrinogen-mediated epidermal cell migration: structural correlates for fibrinogen function. *J Cell Sci*. 1989; 94(1): 101-8.
- Dong X, et al. Actin Gamma 1, a new skin cancer pathogenic gene, identified by the biological feature- based classification. *J Cell Biochem* .2017.
- Farrell DH, et al. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89(22): 10729-32.
- Ghazalpour A, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS genetics*. 2011;7(6): e1001393.
- Gilchrist, BA. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol*. 1996; 135(6) : 867-75.
- Hamadi SA, et al. The role of topical and oral melatonin in management of melasma patients. *J Arab Univers Bas Appl Sci*. 2009; 8: 30-42.
- Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: uma revisão clínica e epidemiológica. *An Bras Dermatol*. 2014; 89(5): 772-83.
- Handog EB, et al. A randomized, double- blind, placebo- controlled trial of oral procyanidin with vitamins A, C, E for melasma among Filipino women. *Int J Dermatol*. 2009; 48(8): 896-901.
- Hernández- Barrera R, et al. Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol*. 2008; 3: 305-8.
- Jablonski NG, Chaplin G. Epidermal pigmentation in the human lineage is an adaptation to ultraviolet radiation. *J Hum Evol*. 2013; 65(5): 671-5.
- Kim YJ, Kang KS, Yokozawa T. The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(7): 2466-71.
- Kunachak S, Panadda L, Wongwaisayawan S. Dermabrasion: a curative treatment for melasma. *Aest Plast Surg*. 2001; 25(2): 114-7.
- Lee AY. Recent progress in melasma pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015; 28(6): 648-60.
- Lee HC, Tien TGS, Goh CL. Oral tranexamic acid (TA) in the treatment of melasma: a retrospective analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2016; 75(2): 385-92.
- Lima, EA. Microneedling in facial recalcitrant melasma: report of a series of 22 cases. *An Bras Dermatol*. 2015; 90(6) : 919-21.

- Lima EVA, Lima MMDA, Paixão MP, Miot HA. Assessment of the effects of skin microneedling as adjuvant therapy for facial melasma: a pilot study. *BMC Dermatol.* 2017; 17(1):14.
- 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 Health Sci.* 2007;53(4):389-96.
- Maranzatto CFP. Desenvolvimento e validação de um questionário multidimensional de avaliação da qualidade de vida relacionada ao melasma (HRQ-Melasma). Dissertação. 2016.
- McCarthy DJ, Smyth GK. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics.* 2009; 25(6): 765-71.
- Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol.* 2009; 84(3): 257-62.
- Mikesh LM, et al. Proteomic anatomy of human skin. *J Proteomics.* 2013; 84: 190-200.
- Miot LD, et al. 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.
- Miot LDB, et al. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol.* 2009; 84: 623-35.
- Park YH, et al. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2009; 66:1493-06.
- Patel, AB; Raj K, Kubba A. Clinicopathological correlation of acquired hyperpigmentary disorders. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013; 79(3): 367-75.
- Reiss MJ, Han YP, Garner WL. α 1- Antichymotrypsin activity correlates with and may modulate matrix metalloproteinase- 9 in human acute wounds. *Wound Repair Regen* 2009; 17(3): 418-26.
- Saha D, et al. Hemoglobin expression in nonerythroid cells: novel or ubiquitous?. *Int J Inflam* 2014; 2014.
- Saha D, et al. Expression of hemoglobin- α and β subunits in human vaginal epithelial cells and their functional significance. *PloS One.* 2017; 12(2): e0171084.
- Scharf P, et al. Uso do pycnogenol no tratamento do melasma. *Surg Cosm Dermatol.* 2015;7(3): 218-22.
- Setaluri V. Autophagy as a melanocytic self-defense mechanism. *J Invest Dermatol.* 2015; 135(5): 1215-7.
- Shahrir M, Saadiah S, Sharifah I. The efficacy and safety of french maritime pine bark extract in the form of MSS complex actinosome on melasma. *Int Med J.* 2004; 3(2): 130-2.
- Sulaimon SS , Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Veter Dermatol* 2003; 14: 57-65.
- Tamega AA, et al. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27:151-6.
- Torres-Álvarez B, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. *Am J Dermatopathol.* 2011; 33(3): 291-5.
- Videira IFS, Moura DFM, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013; 88(1): 76-83.
- Zbytek B, et al. Putative role of HIF transcriptional activity in melanocytes and melanoma biology. *Dermato-Endocrinology.* 2013; 5(01): 239–251.
- Zhou LL, Baibergenova A. Melasma: systematic review of the systemic treatments. *Int J Dermatol.* 2017; 56(9): 902-8.

4. CONCLUSÕES

Foram identificadas 29 proteínas diferencialmente abundantes entre a pele com melasma facial e a adjacente.

As principais funções biológicas das proteínas indicadas são ligadas à glicólise, gliconeogênese, fenômenos de transporte celular, hemostasia, coagulação, reparo / cicatrização e resposta a estímulos externos.

As proteínas ACTG1, ALB, SERPINA1, HBD, ALDOA e FGG, foram indicadas como de maior interação em diferentes processos biológicos, especialmente, fenômenos de transporte, reparo tecidual, coagulação e resposta ao estresse.

5. PERSPECTIVAS

Melasma é uma demanda comum na prática dermatológica, e, até o momento, as terapêuticas são voltadas à via final da síntese e distribuição de melanina. O fato dos tratamentos não atingirem a causa específica da doença pode ser uma das razões que levam a falhas terapêuticas e recidivas. Esse aspecto, associado ao acometimento de áreas visíveis, curso crônico, em, principalmente, mulheres na menacme, inflige grande impacto na sua qualidade de vida, mesmo que a doença seja completamente assintomática. Esses elementos nos motivam a aprofundar o estudo da epidemiologia, clínica, terapêutica e fisiopatologia da doença.

A melanogênese em humanos é um processo complexo e ainda não totalmente esclarecido, visto que a resposta pigmentar à radiação ultravioleta é um ganho evolutivo da espécie, inexistente em primatas cobertos por pelos. Nesse ínterin, a pesquisa sobre a gênese do melasma é intrigante. Quanto mais se investiga sobre as vias de pigmentação, sua genética e o efeito dos fatores ambientais na doença, emergem, não somente novos conceitos sobre pigmentação melânica, mas também novas dúvidas sobre sua regulação.

A exclusividade do acometimento de áreas fotoexpostas, a piora clínica (extensão e intensidade) após a exposição solar e a efetiva prevenção do melasma gestacional pelo uso de filtros solares são indicadores da necessidade de estudo do papel da RUV como indutora do controle epigenético da pigmentação. Além disso, o papel das diferentes radiações UVA, UVB, infravermelha e luz visível, deve ser avaliado no melasma.

A melanogênese depende da atividade integrada da unidade epidermo-melânica e sofre influência de fibroblastos, endotélio e células inflamatórias (p.ex. mastócitos), que geram um ambiente pró-oxidativo na derme superficial. Melanócitos e fibroblastos seriam os principais candidatos a um mosaicismos, já que, submetidos a estímulo ambiental e alteração epigenética pela RUV, inflamação, estresse, medicamentos e hormônios sexuais exógenos, expressariam padrão tipo checkerboard (mosaicismo tipo 2).

O conhecimento de genes específicos alterados diretamente na pele com melasma poderia sinalizar uma opção terapêutica definitiva a partir da terapia gênica, do controle epigenético por drogas, interferência em vias alternativas da melanogênese ou técnicas de reparo do tecido afetado.

O dano oxidativo induzido, especialmente por UVA, na pele foexposta pode induzir à autofagia de queratinócitos, fibroblastos e melanócitos. O maior trânsito de vesículas de transporte citoplasmático pode ser indício desse processo, que deve ser confirmado pela presença de lipofucsina e p62 em estudos posteriores, assim como há necessidade de investigar a senescência da unidade epidermo-melânica e fibroblastos, como indutores de melanogênese focal.

A investigação de vias coagulatórias e de agregação plaquetária também devem ser explorados posteriormente. A expressão epitelial de plasmina, fator de ativação plaquetária e seu receptor, em melanócitos, pode indicar uma via de melanogênese no melasma, assim como sugerir novas intervenções terapêuticas.

Nossos resultados preliminares são intrigantes e motivadores para a persistência da investigação quanto aos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à pele afetada pelo melasma.

6. APÊNDICES

Apêndice 1. Quantificação proteica das amostras processadas para a espectrometria de massas.

AMOSTRA	Média da Absorbância (nm)	Concentração (ug/5uL)	Concentração final (ug/uL)	Massa seca (ug) e digerida com tripsina na proporção 1:50
2C	0,174	1,57	0,31	52,30
3M	0,105	0,27	0,05	6,99
3C	0,188	1,83	0,37	50,05
3R	0,415	6,10	1,22	49,97
4M	0,117	0,50	0,10	15,56
4C	0,113	0,42	0,08	12,70
5M	0,192	1,91	0,38	50,18
5C	0,374	5,33	1,07	50,24
6M	0,109	0,35	0,07	9,39
6C	0,230	2,62	0,52	50,40
7M	0,348	4,84	0,97	50,39
7R	0,554	8,71	1,74	50,05
8M	0,22	2,43	0,49	19,47
8C	0,147	1,06	0,21	33,97
8R	0,361	5,08	1,02	50,31
9M	0,156	1,23	0,25	7,38
9C	0,168	1,46	0,29	50,21
9R	0,393	5,68	1,14	50,29
10M	0,298	3,90	0,78	50,63
10C	0,242	2,85	0,57	50,83
10R	0,406	5,93	1,19	50,23
11M	0,162	1,34	0,27	32,24
11C	0,255	3,09	0,62	50,67
11R	0,439	6,55	1,31	50,00
12M	0,127	0,69	0,14	21,95
12C	0,196	1,98	0,40	39,65
12R	0,378	5,40	1,08	50,01
13M	0,265	3,28	0,66	50,44
13C	0,424	6,27	1,25	50,13
13R	0,630	10,14	2,03	50,18
14M	0,112	0,40	0,08	25,87
14C	0,275	3,47	0,69	50,24
14R	0,558	8,78	1,76	50,19
15M	0,102	0,22	0,04	8,65
15C	0,189	1,85	0,37	29,61
15R	0,430	6,38	1,28	50,22
16M	0,155	1,21	0,24	29,09
16C	0,247	2,94	0,59	50,70
16R	0,389	5,61	1,12	50,07
17M	0,078	0,23	0,05	23,46
17C	0,153	1,17	0,23	42,28
17R	0,476	7,24	1,45	50,29
18M	0,127	0,69	0,14	24,69
18R	0,213	2,30	0,46	50,00
19M	0,345	4,78	0,96	50,00
19C	0,138	0,89	0,18	17,85
19R	0,531	8,28	1,66	50,15
20M	0,112	0,40	0,08	8,08
20C	0,268	3,33	0,67	50,53
21M	0,100	0,18	0,04	51,06
21R	0,348	4,84	0,97	50,39
22R	0,523	8,13	1,63	50,16
22C	0,108	0,33	0,07	13,16

Apêndice 2. Proteínas identificadas nas amostras de pele de melasma facial (M), pele adjacente (P) fotoexposta (n=40).

Código	Proteína	Escore PLGS	Quantificação relativa		Log2(M/P)	Razão (M/P)	p-valor	FDR
			Melasma	Perilesional				
P68032	Actin_ alpha cardiac muscle 1 ACTC1	985,12	1,33 (0,04)	0,67 (0,04)	1,00 (0,07)	1,99	1,00	1,00
A6NL76	Actin_ alpha skeletal muscle ACTA1	475,71	1,20 (0,17)	0,8 (0,17)	0,59 (0,27)	1,51	0,98	0,95
P68133	Actin_ alpha skeletal muscle ACTA1	958,81	1,34 (0,04)	0,66 (0,04)	1,04 (0,07)	2,05	1,00	1,00
F6UVQ4	Actin_ aortic smooth muscle ACTA2	475,71	1,00 (0,32)	1,00 (0,32)	0,00 (0,48)	1,00	0,47	0,49
F6QUT6	Actin_ aortic smooth muscle ACTA2	475,71	1,05 (0,20)	0,95 (0,20)	0,14 (0,30)	1,11	0,69	0,61
P62736	Actin_ aortic smooth muscle ACTA2	1064,04	1,31 (0,04)	0,69 (0,04)	0,94 (0,06)	1,92	1,00	1,00
E7EVS6	Actin_ cytoplasmic 1 ACTB	489,38	0,74 (0,06)	1,26 (0,06)	-0,76 (0,09)	0,59	0,00	0,00
G5E9R0	Actin_ cytoplasmic 1 ACTB	489,38	0,75 (0,05)	1,25 (0,05)	-0,75 (0,08)	0,59	0,00	0,00
P60709	Actin_ cytoplasmic 1 ACTB	1454,49	1,05 (0,04)	0,95 (0,04)	0,14 (0,06)	1,11	0,97	0,93
K7EM38	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	489,38	0,75 (0,07)	1,25 (0,07)	-0,75 (0,11)	0,59	0,00	0,00
I3L3R2	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	489,38	0,75 (0,08)	1,25 (0,08)	-0,74 (0,12)	0,60	0,00	0,00
I3L4N8	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	1185,75	0,98 (0,06)	1,02 (0,06)	-0,06 (0,09)	0,96	0,34	0,41
I3L3I0	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	1164,96	1,40 (0,06)	0,60 (0,06)	1,23 (0,11)	2,34	1,00	1,00
I3L1U9	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	1164,96	1,40 (0,07)	0,60 (0,07)	1,24 (0,12)	2,36	1,00	1,00
J3KT65	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	489,38	0,74 (0,06)	1,26 (0,06)	-0,75 (0,10)	0,59	0,00	0,00
P63261	Actin_ cytoplasmic 2 ACTG1	1524,17	0,97 (0,05)	1,03 (0,05)	-0,07 (0,07)	0,95	0,14	0,22
C9JFL5	Actin_ gamma-enteric smooth muscle ACTG2	475,71	1,22 (0,44)	0,78 (0,44)	0,72 (0,74)	1,65	0,80	0,72
P63267	Actin_ gamma-enteric smooth muscle ACTG2	985,12	1,33 (0,04)	0,67 (0,04)	1,00 (0,07)	1,99	1,00	1,00
C9JCE0	AF4/FMR2 family member 4 AFF4	71,15	0,67 (0,65)	1,33 (0,65)	-1,15 (1,08)	0,45	0,17	0,26
Q9UHB7	AF4/FMR2 family member 4 AFF4	77,40	1,29 (0,56)	0,71 (0,56)	0,97 (1,00)	1,95	0,77	0,69
Q12802	A-kinase anchor protein 13 AKAP13	91,93	1,54 (0,37)	0,46 (0,37)	1,89 (0,84)	3,71	0,97	0,93
A0A087WTD7	A-kinase anchor protein 13 AKAP13	87,85	1,53 (0,40)	0,47 (0,40)	1,96 (1,03)	3,90	0,99	0,97
A8MYJ1	A-kinase anchor protein 13 AKAP13	87,85	1,55 (0,37)	0,45 (0,37)	1,99 (1,13)	3,97	0,98	0,95
A0A0A0MRE9	A-kinase anchor protein 9 AKAP9	12,43	0,35 (0,34)	1,65 (0,34)	-2,39 (1,00)	0,19	0,01	0,03
A0A0A0MRF6	A-kinase anchor protein 9 AKAP9	13,08	0,38 (0,20)	1,62 (0,20)	-2,16 (0,50)	0,22	0,00	0,00
Q99996	A-kinase anchor protein 9 AKAP9	16,30	0,40 (0,24)	1,60 (0,24)	-2,06 (0,55)	0,24	0,00	0,00
C9JKR2	Albumin_ isoform CRA_ k ALB	542,99	0,62 (0,05)	1,38 (0,05)	-1,14 (0,08)	0,45	0,00	0,00
G3V387	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	122,09	0,83 (0,60)	1,17 (0,60)	-0,58 (1,02)	0,67	0,32	0,40
A0A0B4J278	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	122,09	0,85 (0,73)	1,15 (0,73)	-0,53 (1,26)	0,69	0,37	0,44
G3V5R8	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	101,49	0,89 (0,49)	1,11 (0,49)	-0,35 (0,79)	0,79	0,36	0,43
G3V544	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	955,32	1,30 (0,15)	0,70 (0,15)	0,89 (0,24)	1,86	1,00	1,00
G3V2B9	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	1092,60	1,33 (0,13)	0,67 (0,13)	1,00 (0,21)	2,00	1,00	1,00
P01009	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	1595,38	1,13 (0,09)	0,87 (0,09)	0,39 (0,13)	1,31	1,00	1,00
A0A024R617	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	1595,38	1,17 (0,11)	0,83 (0,11)	0,50 (0,16)	1,42	1,00	1,00
A0A0G2JRN3	Alpha-1-antitrypsin SERPINA1	1546,58	1,20 (0,11)	0,80 (0,11)	0,59 (0,16)	1,51	1,00	1,00
C9JV77	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	144,02	1,38 (0,40)	0,62 (0,40)	1,26 (0,63)	2,39	0,96	0,91
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	144,02	1,40 (0,35)	0,60 (0,35)	1,28 (0,69)	2,44	0,97	0,93
P01023	Alpha-2-macroglobulin A2M	296,28	1,07 (0,17)	0,93 (0,17)	0,22 (0,25)	1,16	0,83	0,74
G3V2W4	Alpha-actinin-1 ACTN1	246,73	0,67 (0,54)	1,33 (0,54)	-1,10 (0,92)	0,47	0,13	0,21
H0YJ11	Alpha-actinin-1 ACTN1	59,37	0,69 (0,55)	1,31 (0,55)	-1,08 (1,53)	0,47	0,20	0,28
G3V2N5	Alpha-actinin-1 ACTN1	310,65	0,69 (0,55)	1,31 (0,55)	-1,05 (1,07)	0,48	0,15	0,23

H7C5W8	Alpha-actinin-1 ACTN1	59,37	0,70 (0,61)	1,30 (0,61)	-1,04 (1,18)	0,49	0,15	0,23
H0YJW3	Alpha-actinin-1 ACTN1	93,03	0,72 (0,59)	1,28 (0,59)	-0,98 (1,12)	0,51	0,23	0,31
G3V5M4	Alpha-actinin-1 ACTN1	310,65	0,74 (0,62)	1,26 (0,62)	-0,89 (1,20)	0,54	0,22	0,30
H9KV75	Alpha-actinin-1 ACTN1	352,99	0,64 (0,46)	1,36 (0,46)	-1,20 (0,82)	0,44	0,09	0,16
P12814	Alpha-actinin-1 ACTN1	464,40	0,64 (0,42)	1,36 (0,42)	-1,17 (0,77)	0,44	0,09	0,16
O43707	Alpha-actinin-4 ACTN4	288,06	0,82 (0,37)	1,18 (0,37)	-0,53 (0,58)	0,69	0,16	0,25
K7EM90	Alpha-enolase ENO1	140,92	1,15 (0,15)	0,85 (0,15)	0,43 (0,22)	1,35	0,97	0,93
P06733	Alpha-enolase ENO1	71,52	1,25 (0,07)	0,75 (0,07)	0,72 (0,10)	1,65	1,00	1,00
Q8N7X0	Androglobin ADGB	69,19	0,48 (0,21)	1,52 (0,21)	-1,69 (0,40)	0,31	0,02	0,05
Q5T3N0	Annexin ANXA1	1056,57	0,90 (0,41)	1,1 (0,41)	-0,32 (0,64)	0,80	0,31	0,39
Q5T3N1	Annexin ANXA1	1056,57	0,94 (0,46)	1,06 (0,46)	-0,17 (0,76)	0,89	0,36	0,43
H0YMW4	Annexin ANXA2	361,01	0,96 (0,14)	1,04 (0,14)	-0,13 (0,21)	0,91	0,32	0,40
H0YKX9	Annexin ANXA2	361,01	0,96 (0,16)	1,04 (0,16)	-0,12 (0,23)	0,92	0,32	0,40
H0YMT9	Annexin ANXA2	361,01	0,96 (0,19)	1,04 (0,19)	-0,12 (0,27)	0,92	0,31	0,39
H0YKL9	Annexin ANXA2	361,01	0,96 (0,16)	1,04 (0,16)	-0,10 (0,24)	0,93	0,36	0,43
H0YKZ7	Annexin ANXA2	361,01	0,97 (0,16)	1,03 (0,16)	-0,09 (0,24)	0,94	0,41	0,46
H0YMM1	Annexin ANXA2	478,74	1,04 (0,12)	0,96 (0,12)	0,10 (0,17)	1,07	0,73	0,65
H0YKS4	Annexin ANXA2	478,74	1,09 (0,12)	0,91 (0,12)	0,26 (0,17)	1,20	0,93	0,86
H0YN42	Annexin ANXA2	478,74	1,09 (0,12)	0,91 (0,12)	0,27 (0,17)	1,21	0,89	0,81
H0YMD0	Annexin ANXA2	478,74	1,10 (0,13)	0,90 (0,13)	0,29 (0,19)	1,22	0,90	0,82
H0YM50	Annexin ANXA2	117,73	1,30 (0,23)	0,70 (0,23)	0,92 (0,38)	1,90	0,98	0,95
H0YNP5	Annexin ANXA2	117,73	1,33 (0,25)	0,67 (0,25)	1,01 (0,41)	2,01	0,98	0,95
H0YNA0	Annexin ANXA2	117,73	1,33 (0,29)	0,67 (0,29)	1,02 (0,50)	2,03	0,97	0,93
H0YN28	Annexin ANXA2	117,73	1,33 (0,26)	0,67 (0,26)	1,02 (0,44)	2,03	0,99	0,97
H0YL33	Annexin ANXA2	117,73	1,34 (0,26)	0,66 (0,26)	1,05 (0,43)	2,08	0,98	0,95
H0YN52	Annexin ANXA2	117,73	1,35 (0,28)	0,65 (0,28)	1,08 (0,43)	2,12	0,98	0,95
P04083	Annexin A1 ANXA1	1056,57	0,91 (0,40)	1,09 (0,40)	-0,27 (0,61)	0,83	0,34	0,41
H0YKV8	Annexin A2 ANXA2	361,01	1,00 (0,13)	1,00 (0,13)	-0,01 (0,18)	0,99	0,54	0,52
H0YMD9	Annexin A2 ANXA2	361,01	1,00 (0,15)	1,00 (0,15)	-0,01 (0,22)	0,99	0,49	0,49
P07355	Annexin A2 ANXA2	513,94	1,01 (0,13)	0,99 (0,13)	0,04 (0,19)	1,03	0,59	0,54
H0YLV6	Annexin ANXA2	361,01	0,95 (0,17)	1,05 (0,17)	-0,13 (0,25)	0,91	0,30	0,38
H0YMU9	Annexin ANXA2	478,74	1,10 (0,12)	0,90 (0,12)	0,29 (0,17)	1,22	0,90	0,82
F8W696	Apolipoprotein A-I APOA1	199,64	0,92 (0,09)	1,08 (0,09)	-0,25 (0,13)	0,84	0,06	0,12
P02647	Apolipoprotein A-I APOA1	271,30	0,96 (0,08)	1,04 (0,08)	-0,12 (0,12)	0,92	0,16	0,25
Q8NCT1	Arrestin domain-containing protein 4 ARRDC4	28,00	1,06 (0,18)	0,94 (0,18)	0,19 (0,27)	1,14	0,78	0,70
K7EQH4	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial ATP5A1	717,22	1,03 (0,30)	0,97 (0,3)	0,10 (0,45)	1,07	0,52	0,51
K7EK77	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial ATP5A1	750,63	1,03 (0,31)	0,97 (0,31)	0,10 (0,47)	1,07	0,59	0,54
K7EJP1	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial ATP5A1	717,22	1,05 (0,32)	0,95 (0,32)	0,14 (0,48)	1,11	0,59	0,54
K7ERX7	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial ATP5A1	750,63	1,06 (0,30)	0,94 (0,30)	0,19 (0,42)	1,14	0,60	0,54
K7ESA0	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial ATP5A1	345,31	0,94 (0,53)	1,06 (0,53)	-0,19 (0,87)	0,88	0,39	0,45
P25705	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial ATP5A1	750,63	1,06 (0,30)	0,94 (0,30)	0,19 (0,45)	1,14	0,62	0,56
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 ACTBL2	101,00	1,43 (0,07)	0,57 (0,07)	1,34 (0,12)	2,53	1,00	1,00
E5RG95	Beta-enolase ENO3	459,07	1,17 (0,18)	0,83 (0,18)	0,49 (0,27)	1,40	0,97	0,93
K7EKN2	Beta-enolase ENO3	459,07	1,19 (0,19)	0,81 (0,19)	0,56 (0,30)	1,48	0,95	0,90
K7EPM1	Beta-enolase ENO3	459,07	1,19 (0,17)	0,81 (0,17)	0,56 (0,26)	1,48	0,97	0,93

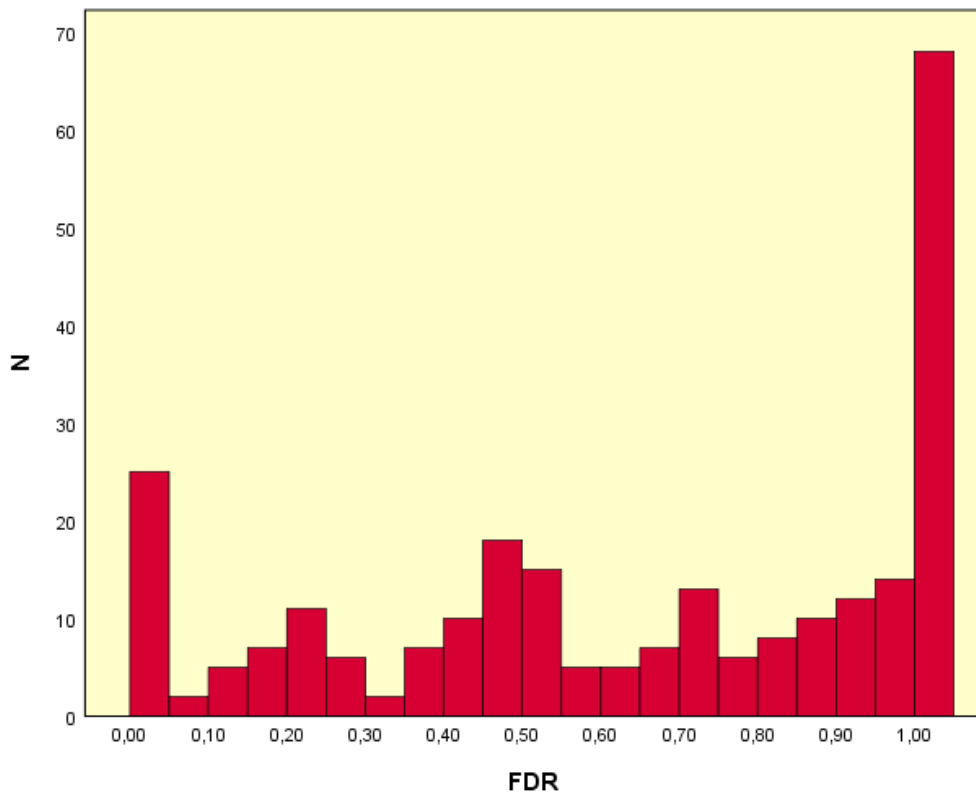
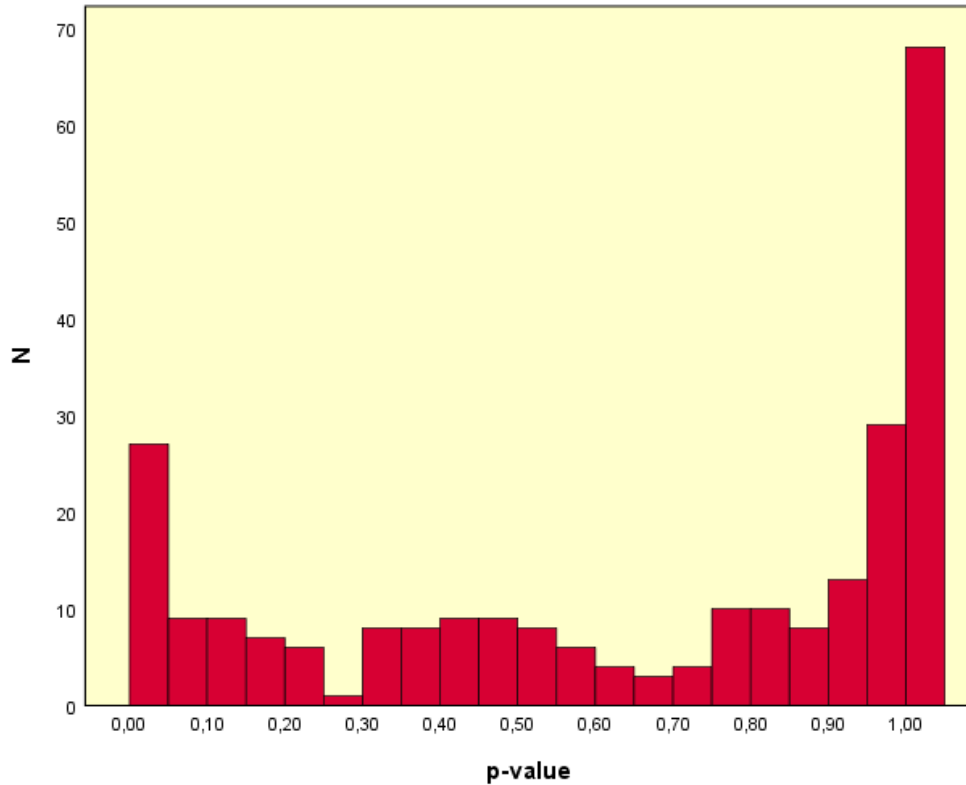
E5RI09	Beta-enolase ENO3	459,07	1,19 (0,18)	0,81 (0,18)	0,58 (0,28)	1,49	0,99	0,97
E5RGZ4	Beta-enolase ENO3	707,91	1,20 (0,19)	0,80 (0,19)	0,61 (0,29)	1,52	0,95	0,90
P13929	Beta-enolase ENO3	741,72	1,12 (0,18)	0,88 (0,18)	0,33 (0,27)	1,26	0,86	0,78
A0A1W2PQ65	BTB/POZ domain-containing protein KCTD7	53,81	1,57 (0,17)	0,43 (0,17)	1,90 (0,40)	3,74	1,00	1,00
E5RJF6	Carbonic anhydrase 1 CA1	1112,39	0,39 (0,17)	1,61 (0,17)	-2,09 (0,45)	0,23	0,00	0,00
H0YBE2	Carbonic anhydrase 1 CA1	1386,45	0,47 (0,13)	1,53 (0,13)	-1,70 (0,27)	0,31	0,00	0,00
E5RH81	Carbonic anhydrase 1 CA1	1818,13	0,95 (0,24)	1,05 (0,24)	-0,16 (0,35)	0,90	0,46	0,48
E5RG43	Carbonic anhydrase 1 CA1	831,51	1,16 (0,11)	0,84 (0,11)	0,46 (0,16)	1,38	0,99	0,97
E5RFE7	Carbonic anhydrase 1 CA1	411,07	1,16 (0,07)	0,84 (0,07)	0,46 (0,10)	1,38	1,00	1,00
E5RIF9	Carbonic anhydrase 1 CA1	831,51	1,17 (0,11)	0,83 (0,11)	0,50 (0,17)	1,42	1,00	1,00
E5RHP7	Carbonic anhydrase 1 CA1	1981,49	1,27 (0,08)	0,73 (0,08)	0,79 (0,13)	1,73	1,00	1,00
E5RGU8	Carbonic anhydrase 1 CA1	487,24	1,29 (0,11)	0,71 (0,11)	0,87 (0,17)	1,82	1,00	1,00
E5RFL2	Carbonic anhydrase 1 CA1	607,36	1,29 (0,11)	0,71 (0,11)	0,87 (0,17)	1,82	1,00	1,00
E5RJ18	Carbonic anhydrase 1 CA1	1275,75	1,36 (0,17)	0,64 (0,17)	1,08 (0,27)	2,12	1,00	1,00
P00915	Carbonic anhydrase 1 CA1	467,10	1,18 (0,05)	0,82 (0,05)	0,52 (0,07)	1,43	1,00	1,00
E5RG81	Carbonic anhydrase 1 CA1	411,07	1,20 (0,07)	0,80 (0,07)	0,59 (0,10)	1,51	1,00	1,00
E5RII2	Carbonic anhydrase 1 CA1	431,68	1,30 (0,13)	0,70 (0,13)	0,88 (0,22)	1,84	1,00	1,00
H7C5R1	Ceruloplasmin CP	76,55	1,40 (0,17)	0,60 (0,17)	1,23 (0,30)	2,34	1,00	1,00
E9PFZ2	Ceruloplasmin CP	85,85	1,37 (0,17)	0,63 (0,17)	1,13 (0,29)	2,18	1,00	1,00
P00450	Ceruloplasmin CP	85,85	1,43 (0,15)	0,57 (0,15)	1,34 (0,27)	2,53	1,00	1,00
H0YAS8	Clusterin CLU	258,67	1,20 (0,45)	0,80 (0,45)	0,62 (0,73)	1,54	0,75	0,67
H0YC35	Clusterin CLU	273,10	1,26 (0,41)	0,74 (0,41)	0,82 (0,69)	1,77	0,82	0,74
P10909	Clusterin CLU	276,32	1,21 (0,41)	0,79 (0,41)	0,66 (0,66)	1,58	0,75	0,67
Q9BXJ0	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5 C1QTNF5	130,67	1,04 (0,48)	0,96 (0,48)	0,13 (0,76)	1,09	0,54	0,52
P01024	Complement C3 C3	173,66	1,16 (0,36)	0,84 (0,36)	0,49 (0,57)	1,40	0,77	0,69
Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2 DPYSL2	147,83	1,27 (0,26)	0,73 (0,26)	0,81 (0,43)	1,75	0,96	0,91
H0Y5T4	DNA polymerase zeta catalytic subunit REV3L	73,85	1,58 (0,34)	0,42 (0,34)	2,03 (0,86)	4,10	0,98	0,95
O60673	DNA polymerase zeta catalytic subunit REV3L	153,25	1,52 (0,06)	0,48 (0,06)	1,66 (0,12)	3,16	1,00	1,00
Q13426	DNA repair protein XRCC4 XRCC4	71,86	1,22 (0,07)	0,78 (0,07)	0,63 (0,12)	1,55	1,00	1,00
A0A087WVQ9	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	105,06	0,87 (0,17)	1,13 (0,17)	-0,39 (0,25)	0,76	0,07	0,14
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	110,06	1,04 (0,15)	0,96 (0,15)	0,12 (0,21)	1,08	0,70	0,62
Q8NEV8	Exophilin-5 EXPH5	40,12	1,79 (0,12)	0,21 (0,12)	3,16 (0,48)	8,94	1,00	1,00
P49327	Fatty acid synthase FASN	96,47	1,17 (0,03)	0,83 (0,03)	0,49 (0,05)	1,40	1,00	1,00
A0A0U1RQF0	Fatty acid synthase FASN	91,34	1,19 (0,04)	0,81 (0,04)	0,55 (0,06)	1,46	1,00	1,00
Q5T376	FERM domain containing 4A_isoform CRA_c FRMD4A	158,29	1,05 (0,10)	0,95 (0,10)	0,13 (0,15)	1,09	0,87	0,79
A0A1W2PQE7	FERM domain-containing protein 4A FRMD4A	158,29	1,04 (0,09)	0,96 (0,09)	0,10 (0,14)	1,07	0,81	0,72
Q9P2Q2	FERM domain-containing protein 4A FRMD4A	159,19	1,03 (0,09)	0,97 (0,09)	0,10 (0,13)	1,07	0,76	0,68
C9JA15	FERM domain-containing protein 4B FRMD4B	158,29	1,03 (0,10)	0,97 (0,10)	0,09 (0,15)	1,06	0,71	0,63
C9J6Q2	FERM domain-containing protein 4B FRMD4B	158,29	1,04 (0,08)	0,96 (0,08)	0,10 (0,12)	1,07	0,82	0,74
C9JAW0	FERM domain-containing protein 4B FRMD4B	158,29	1,04 (0,09)	0,96 (0,09)	0,10 (0,13)	1,07	0,81	0,72
C9J7M5	FERM domain-containing protein 4B FRMD4B	158,29	1,04 (0,09)	0,96 (0,09)	0,10 (0,13)	1,07	0,80	0,72
Q9Y2L6	FERM domain-containing protein 4B FRMD4B	158,29	1,04 (0,09)	0,96 (0,09)	0,10 (0,14)	1,07	0,80	0,72
P02679	Fibrinogen gamma chain FGG	211,06	1,31 (0,16)	0,69 (0,16)	0,94 (0,25)	1,92	1,00	1,00
C9JC84	Fibrinogen gamma chain FGG	211,06	1,33 (0,16)	0,67 (0,16)	1,01 (0,25)	2,01	1,00	1,00
C9JEU5	Fibrinogen gamma chain FGG	211,06	1,34 (0,14)	0,66 (0,14)	1,04 (0,24)	2,05	1,00	1,00

Q60FE5	Filamin A FLNA	306,42	0,68 (0,46)	1,32 (0,46)	-1,08 (0,87)	0,47	0,14	0,22
H0Y5C6	Filamin-A FLNA	266,28	0,69 (0,52)	1,31 (0,52)	-1,01 (0,92)	0,50	0,14	0,22
Q5HY54	Filamin-A FLNA	307,48	0,67 (0,53)	1,33 (0,53)	-1,11 (1,03)	0,46	0,16	0,25
A0A087WWY3	Filamin-A FLNA	204,09	0,71 (0,46)	1,29 (0,46)	-0,94 (0,74)	0,52	0,11	0,19
P21333	Filamin-A FLNA	309,38	0,77 (0,23)	1,23 (0,23)	-0,68 (0,36)	0,63	0,03	0,07
H3BU78	Fructose-bisphosphate aldolase ALDOA	295,30	1,20 (0,31)	0,80 (0,31)	0,62 (0,48)	1,54	0,85	0,77
H3BR04	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	153,06	1,45 (0,09)	0,55 (0,09)	1,41 (0,16)	2,66	1,00	1,00
H3BPS8	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	153,06	1,46 (0,07)	0,54 (0,07)	1,43 (0,14)	2,69	1,00	1,00
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	296,85	1,45 (0,07)	0,55 (0,07)	1,41 (0,13)	2,66	1,00	1,00
J3KPS3	Fructose-bisphosphate aldolase ALDOA	295,30	1,46 (0,10)	0,54 (0,10)	1,43 (0,17)	2,69	1,00	1,00
H3BQN4	Fructose-bisphosphate aldolase ALDOA	295,30	1,47 (0,08)	0,53 (0,08)	1,46 (0,14)	2,75	1,00	1,00
Q9BRR8	G patch domain-containing protein 1 GPATCH1	95,48	1,37 (0,14)	0,63 (0,14)	1,13 (0,25)	2,18	1,00	1,00
K7EQ19	G patch domain-containing protein 1 GPATCH1	88,85	1,60 (0,28)	0,40 (0,28)	2,15 (0,66)	4,44	1,00	1,00
P47929	Galectin-7 LGALS7	416,35	0,94 (0,10)	1,06 (0,10)	-0,17 (0,14)	0,89	0,10	0,18
F5H1C3	Gamma-enolase ENO2	459,07	1,18 (0,20)	0,82 (0,20)	0,52 (0,30)	1,43	0,94	0,88
P09104	Gamma-enolase ENO2	899,98	1,17 (0,20)	0,83 (0,20)	0,52 (0,30)	1,43	0,94	0,88
F5H0C8	Gamma-enolase ENO2	860,22	1,19 (0,19)	0,81 (0,19)	0,55 (0,29)	1,46	0,96	0,91
P06396	Gelsolin GSN	505,33	0,98 (0,19)	1,02 (0,19)	-0,04 (0,28)	0,97	0,45	0,48
A0A0A0MS51	Gelsolin GSN	501,88	1,02 (0,23)	0,98 (0,23)	0,07 (0,33)	1,05	0,59	0,54
A0A0A0MT01	Gelsolin GSN	501,88	1,03 (0,20)	0,97 (0,2)	0,10 (0,30)	1,07	0,62	0,56
H7C010	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 GCC2	126,80	1,03 (0,32)	0,97 (0,32)	0,10 (0,48)	1,07	0,55	0,52
Q8IWJ2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 GCC2	137,61	0,78 (0,28)	1,22 (0,28)	-0,65 (0,44)	0,64	0,09	0,16
G3V1N2	HCG1745306_isoform CRA_a HBA2	8359,50	1,10 (0,02)	0,90 (0,02)	0,30 (0,03)	1,23	1,00	1,00
I3L239	Heat shock protein 75 kDa_mitochondrial TRAP1	124,78	1,32 (0,14)	0,68 (0,14)	0,98 (0,22)	1,97	1,00	1,00
I3L0K7	Heat shock protein 75 kDa_mitochondrial TRAP1	124,78	1,22 (0,36)	0,78 (0,36)	0,66 (0,56)	1,58	0,82	0,74
Q12931	Heat shock protein 75 kDa_mitochondrial TRAP1	124,78	1,43 (0,13)	0,57 (0,13)	1,34 (0,24)	2,53	1,00	1,00
C9J3N8	Heat shock protein beta-1 HSPB1	1147,88	0,61 (0,46)	1,39 (0,46)	-1,31 (0,93)	0,40	0,08	0,15
P04792	Heat shock protein beta-1 HSPB1	1626,41	0,69 (0,41)	1,31 (0,41)	-1,00 (0,69)	0,50	0,07	0,14
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	108,83	1,21 (0,29)	0,79 (0,29)	0,63 (0,45)	1,55	0,87	0,79
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	106,20	1,20 (0,40)	0,80 (0,40)	0,62 (0,58)	1,54	0,83	0,74
P69905	Hemoglobin subunit alpha HBA1	8552,23	1,57 (0,02)	0,43 (0,02)	1,88 (0,04)	3,67	1,00	1,00
F8W6P5	Hemoglobin subunit beta HBB	3529,62	0,97 (0,02)	1,03 (0,02)	-0,07 (0,03)	0,95	0,00	0,00
A0A0J9YWK4	Hemoglobin subunit beta HBB	91,85	0,65 (0,05)	1,35 (0,05)	-1,07 (0,08)	0,48	0,00	0,00
P68871	Hemoglobin subunit beta HBB	3796,22	1,22 (0,01)	0,78 (0,01)	0,65 (0,01)	1,57	1,00	1,00
E9PEW8	Hemoglobin subunit delta HBD	556,86	1,13 (0,01)	0,87 (0,01)	0,38 (0,02)	1,30	1,00	1,00
C9JRG0	Hemoglobin subunit delta HBD	42,06	1,94 (0,02)	0,06 (0,02)	5,05 (0,31)	33,12	1,00	1,00
E9PFT6	Hemoglobin subunit delta HBD	556,86	1,13 (0,02)	0,87 (0,02)	0,38 (0,02)	1,30	1,00	1,00
P02042	Hemoglobin subunit delta HBD	758,70	1,24 (0,01)	0,76 (0,01)	0,71 (0,02)	1,63	1,00	1,00
A8MUF7	Hemoglobin subunit epsilon HBE1	517,28	0,96 (0,02)	1,04 (0,02)	-0,12 (0,02)	0,92	0,00	0,00
P02100	Hemoglobin subunit epsilon HBE1	517,28	0,96 (0,02)	1,04 (0,02)	-0,12 (0,02)	0,92	0,00	0,00
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1 HBG1	517,28	0,96 (0,02)	1,04 (0,02)	-0,12 (0,03)	0,92	0,00	0,00
E9PBW4	Hemoglobin subunit gamma-2 HBG2	517,28	0,89 (0,11)	1,11 (0,11)	-0,32 (0,17)	0,80	0,00	0,00
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2 HBG2	517,28	1,06 (0,02)	0,94 (0,02)	0,17 (0,04)	1,13	1,00	1,00
P02790	Hemopexin HPX	813,96	0,65 (0,64)	1,35 (0,64)	-1,27 (1,31)	0,41	0,13	0,21
A0A0A0MS08	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 IGHC1	2505,49	0,81 (0,27)	1,19 (0,27)	-0,56 (0,42)	0,68	0,13	0,21

P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 IGHG1	2505,49	0,99 (0,19)	1,01 (0,19)	-0,03 (0,28)	0,98	0,49	0,49
P01834	Immunoglobulin kappa constant IGKC	2687,67	0,91 (0,09)	1,09 (0,09)	-0,26 (0,13)	0,84	0,05	0,10
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1 IGLC1	999,20	1,05 (0,17)	0,95 (0,17)	0,14 (0,25)	1,11	0,71	0,63
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2 IGLC2	1282,02	1,07 (0,16)	0,93 (0,16)	0,22 (0,24)	1,16	0,77	0,69
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3 IGLC3	1282,02	1,00 (0,18)	1,00 (0,18)	0,01 (0,26)	1,01	0,48	0,49
P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6 IGLC6	1282,02	1,00 (0,19)	1,00 (0,19)	-0,01 (0,27)	0,99	0,51	0,51
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7 IGLC7	917,33	1,01 (0,15)	0,99 (0,15)	0,03 (0,22)	1,02	0,52	0,51
A0A0B4J231	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 IGLL5	999,20	1,04 (0,21)	0,96 (0,21)	0,12 (0,30)	1,08	0,66	0,59
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 IGLL5	999,20	1,02 (0,17)	0,98 (0,17)	0,07 (0,25)	1,05	0,65	0,58
F5H6C2	Intraflagellar transport protein 88 homolog IFT88	61,37	0,99 (0,29)	1,01 (0,29)	-0,03 (0,44)	0,98	0,53	0,51
Q13099	Intraflagellar transport protein 88 homolog IFT88	61,37	0,82 (0,33)	1,18 (0,33)	-0,53 (0,44)	0,69	0,18	0,26
P35527	Keratin_type I cytoskeletal 9 KRT9	340,12	1,61 (0,13)	0,39 (0,13)	2,05 (0,27)	4,14	1,00	1,00
K7EQQ3	Keratin_type I cytoskeletal 9 KRT9	190,36	1,60 (0,26)	0,40 (0,26)	2,06 (0,62)	4,18	1,00	1,00
P04264	Keratin_type II cytoskeletal 1 KRT1	55,74	1,62 (0,06)	0,38 (0,06)	2,08 (0,14)	4,22	1,00	1,00
Q9NZI2	Kv channel-interacting protein 1 KCNIP1	41,04	0,96 (0,46)	1,04 (0,46)	-0,10 (0,72)	0,93	0,42	0,46
A0A0C4DFQ7	Kv channel-interacting protein 1 KCNIP1	41,04	0,97 (0,43)	1,03 (0,43)	-0,07 (0,67)	0,95	0,42	0,46
A0A1B0GTZ7	Kv channel-interacting protein 1 KCNIP1	41,04	0,94 (0,45)	1,06 (0,45)	-0,20 (0,74)	0,87	0,36	0,43
A0A087WTU8	Kv channel-interacting protein 1 KCNIP1	41,04	0,96 (0,40)	1,04 (0,40)	-0,12 (0,61)	0,92	0,49	0,49
A0A0A0MS16	Kv channel-interacting protein 1 KCNIP1	41,04	0,97 (0,46)	1,03 (0,46)	-0,10 (0,72)	0,93	0,44	0,47
P51884	Lumican LUM	161,31	1,11 (0,05)	0,89 (0,05)	0,32 (0,08)	1,25	1,00	1,00
Q5VU43	Myomegalin PDE4DIP	55,10	1,29 (0,37)	0,71 (0,37)	0,92 (0,63)	1,90	0,94	0,88
A0A075B749	Myomegalin PDE4DIP	54,27	1,30 (0,42)	0,70 (0,42)	0,92 (0,77)	1,90	0,91	0,84
A0A0A0MRM0	Myomegalin PDE4DIP	54,27	1,31 (0,38)	0,69 (0,38)	0,98 (0,66)	1,97	0,91	0,84
A0A087WX83	Myomegalin PDE4DIP	54,27	1,32 (0,33)	0,68 (0,33)	1,01 (0,56)	2,01	0,96	0,91
A0A087WVF8	Myomegalin PDE4DIP	54,27	1,33 (0,36)	0,67 (0,36)	1,05 (0,66)	2,08	0,92	0,85
A0A0A0MRM1	Myomegalin PDE4DIP	54,27	1,34 (0,35)	0,66 (0,35)	1,07 (0,63)	2,10	0,95	0,90
A6NIW5	Peroxiredoxin 2_ isoform CRA_a PRDX2	1011,62	1,06 (0,18)	0,94 (0,18)	0,16 (0,27)	1,12	0,77	0,69
P32119	Peroxiredoxin-2 PRDX2	2725,34	1,15 (0,12)	0,85 (0,12)	0,45 (0,19)	1,36	1,00	1,00
P30041	Peroxiredoxin-6 PRDX6	347,02	1,19 (0,27)	0,81 (0,27)	0,59 (0,43)	1,51	0,92	0,85
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 PEBP1	433,44	0,85 (0,31)	1,15 (0,31)	-0,45 (0,47)	0,73	0,21	0,29
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E POTEE	141,58	1,17 (0,07)	0,83 (0,07)	0,50 (0,10)	1,42	1,00	1,00
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F POTEF	101,00	1,47 (0,07)	0,53 (0,07)	1,49 (0,14)	2,80	1,00	1,00
A0A0C4DGC5	Prelamin-A/C LMNA	330,53	1,14 (0,22)	0,86 (0,22)	0,42 (0,30)	1,34	0,88	0,80
Q5TCI8	Prelamin-A/C LMNA	855,15	1,16 (0,15)	0,84 (0,15)	0,48 (0,22)	1,39	0,98	0,95
P02545	Prelamin-A/C LMNA	942,60	1,17 (0,11)	0,83 (0,11)	0,50 (0,17)	1,42	1,00	1,00
Q3BDU5	Prelamin-A/C LMNA	669,13	1,17 (0,29)	0,83 (0,29)	0,52 (0,48)	1,43	0,85	0,77
K7EN27	Protein DJ-1 PARK7	119,01	1,03 (0,45)	0,97 (0,45)	0,10 (0,69)	1,07	0,57	0,53
K7ELW0	Protein DJ-1 PARK7	266,65	0,96 (0,66)	1,04 (0,66)	-0,13 (1,15)	0,91	0,43	0,47
Q99497	Protein DJ-1 PARK7	141,59	0,97 (0,33)	1,03 (0,33)	-0,10 (0,48)	0,93	0,43	0,47
H0YBA5	Protein FAM184A FAM184A	86,87	0,86 (0,82)	1,14 (0,82)	-0,50 (1,56)	0,70	0,38	0,44
H0YBC0	Protein FAM184A FAM184A	84,09	0,95 (0,82)	1,05 (0,82)	-0,13 (1,69)	0,91	0,47	0,49
A0A087X2A7	Protein FAM184A FAM184A	94,11	0,92 (0,82)	1,08 (0,82)	-0,36 (1,70)	0,78	0,42	0,46
H7BY63	Protein FAM184A FAM184A	82,41	0,92 (0,79)	1,08 (0,79)	-0,30 (1,61)	0,81	0,40	0,46
A0A0C4DGZ2	Protein FAM184A FAM184A	84,09	1,05 (0,82)	0,95 (0,82)	0,19 (1,75)	1,14	0,54	0,52
Q8NB25	Protein FAM184A FAM184A	95,77	0,95 (0,72)	1,05 (0,72)	-0,22 (1,38)	0,86	0,48	0,49

A6NMY6	Putative annexin A2-like protein ANXA2P2	123,73	1,18 (0,27)	0,82 (0,27)	0,53 (0,41)	1,45	0,89	0,81
Q9BYX7	Putative beta-actin-like protein 3 POTEKP	101,00	1,47 (0,09)	0,53 (0,09)	1,47 (0,16)	2,77	1,00	1,00
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 EEF1A1P5	105,06	0,91 (0,20)	1,09 (0,20)	-0,26 (0,30)	0,84	0,28	0,36
REVERSE14098	Reversed Sequence 14098	83,09	0,93 (0,56)	1,07 (0,56)	-0,22 (0,92)	0,86	0,37	0,44
REVERSE5251	Reversed Sequence 5251	98,48	1,14 (0,15)	0,86 (0,15)	0,40 (0,22)	1,32	0,97	0,93
REVERSE7829	Reversed Sequence 7829	146,50	0,70 (0,45)	1,30 (0,45)	-0,95 (0,78)	0,52	0,11	0,19
P49756	RNA-binding protein 25 RBM25	29,17	1,57 (0,12)	0,43 (0,12)	1,86 (0,25)	3,63	1,00	1,00
Q14BN4	Sarcolemmal membrane-associated protein SLMAP	87,43	0,75 (0,44)	1,25 (0,44)	-0,81 (0,80)	0,57	0,20	0,28
Q96Q15	Serine/threonine-protein kinase SMG1	39,09	1,52 (0,48)	0,48 (0,48)	1,86 (1,26)	3,63	0,94	0,88
H7C013	Serum albumin ALB	5862,44	0,54 (0,18)	1,46 (0,18)	-1,44 (0,32)	0,37	0,00	0,00
H0YA55	Serum albumin ALB	542,99	0,63 (0,04)	1,37 (0,04)	-1,14 (0,07)	0,45	0,00	0,00
D6RHD5	Serum albumin ALB	542,99	0,52 (0,07)	1,48 (0,07)	-1,50 (0,12)	0,35	0,00	0,00
P02769	Serum albumin ALB	2923,53	0,62 (0,10)	1,38 (0,10)	-1,17 (0,17)	0,44	0,00	0,00
B7WNR0	Serum albumin ALB	542,99	0,63 (0,06)	1,37 (0,06)	-1,11 (0,10)	0,46	0,00	0,00
A0A087WWT3	Serum albumin ALB	486,61	0,64 (0,06)	1,36 (0,06)	-1,07 (0,09)	0,48	0,00	0,00
A0A0C4DGB6	Serum albumin ALB	534,91	0,66 (0,08)	1,34 (0,08)	-1,04 (0,12)	0,49	0,00	0,00
P02768	Serum albumin ALB	678,04	1,09 (0,03)	0,91 (0,03)	0,26 (0,05)	1,20	1,00	1,00
Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1 SREK1	79,89	1,41 (0,26)	0,59 (0,26)	1,28 (0,48)	2,44	1,00	1,00
Q6UWP8	Suprabasin SBSN	79,13	1,05 (0,26)	0,95 (0,26)	0,14 (0,38)	1,11	0,62	0,56
Q5T4T6	Synaptonemal complex protein 2-like SYCP2L	35,62	1,41 (0,54)	0,59 (0,54)	1,44 (1,09)	2,72	0,90	0,82
K7N7B3	Synaptonemal complex protein 2-like SYCP2L	32,01	1,40 (0,49)	0,60 (0,49)	1,41 (1,04)	2,66	0,90	0,82
H9KV93	Tetratricopeptide repeat protein 21B TTC21B	59,39	1,26 (0,15)	0,74 (0,15)	0,79 (0,24)	1,73	1,00	1,00
Q7Z4L5	Tetratricopeptide repeat protein 21B TTC21B	63,47	1,26 (0,14)	0,74 (0,14)	0,78 (0,22)	1,72	1,00	1,00
D6RDA0	Tetratricopeptide repeat protein 37 TTC37	443,53	1,45 (0,21)	0,55 (0,21)	1,44 (0,42)	2,72	1,00	1,00
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37 TTC37	449,05	1,46 (0,18)	0,54 (0,18)	1,47 (0,36)	2,77	1,00	1,00
U3KPS5	Triosephosphate isomerase TPI1	59,00	1,27 (0,49)	0,73 (0,49)	0,88 (0,89)	1,84	0,79	0,71
U3KQF3	Triosephosphate isomerase TPI1	475,34	1,39 (0,25)	0,61 (0,25)	1,23 (0,41)	2,34	0,99	0,97
U3KPZ0	Triosephosphate isomerase TPI1	475,34	1,41 (0,22)	0,59 (0,22)	1,28 (0,40)	2,44	0,99	0,97
P60174	Triosephosphate isomerase TPI1	576,90	1,43 (0,19)	0,57 (0,19)	1,34 (0,37)	2,53	1,00	1,00
C9J659	Very large A-kinase anchor protein CRYBG3	89,65	0,47 (0,43)	1,53 (0,43)	-2,02 (1,11)	0,25	0,03	0,07
Q68DQ2	Very large A-kinase anchor protein CRYBG3	95,25	0,54 (0,48)	1,46 (0,48)	-1,62 (1,00)	0,33	0,06	0,12
B0YJC5	Vimentin VIM	270,35	0,97 (0,08)	1,03 (0,08)	-0,09 (0,12)	0,94	0,21	0,29
B0YJC4	Vimentin VIM	286,85	0,99 (0,07)	1,01 (0,07)	-0,01 (0,10)	0,99	0,43	0,47
P08670	Vimentin VIM	301,46	1,02 (0,04)	0,98 (0,04)	0,06 (0,06)	1,04	0,79	0,71
Q5T200	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13 ZC3H13	36,84	1,01 (0,47)	0,99 (0,47)	0,03 (0,74)	1,02	0,53	0,51

Apêndice 3. Histograma dos p-valores referentes aos testes de comparação dependentes das proteínas identificadas entre as topografias, sem e com a correção para (FDR) *False Discovery Rate* (0,05).



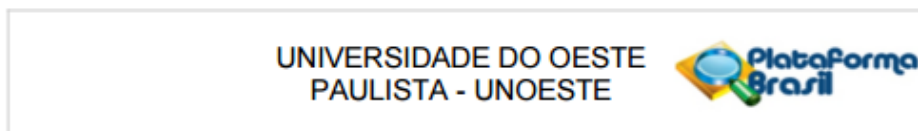
*

Apêndice 4. Mapa de interação entre as 29 proteínas identificadas e suas 34 funções.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	
F1																■													■	
F2																														■
F3								■																■						
F4		■			■	■																								
F5		■			■	■		■																						
F6							■													■	■	■								
F7		■			■	■				■										■	■	■								
F8					■	■																								
F9																														
F10		■			■	■																■								
F11		■																												
F12																														
F13		■			■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■								
F14					■	■																								
F15												■																		
F16																														
F17		■			■																									
F18								■		■																				
F19																														
F20																														
F21																														
F22																														
F23																														
F24		■			■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■								
F25					■																									■
F26																														
F27		■			■	■																								
F28																														
F29																														
F30		■																												
F31								■		■																				
F32					■	■		■		■																				
F33																														
F34		■			■	■																								

7. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO PROTEÔMICO DO MELASMA FACIAL EM MULHERES

Pesquisador: Luiza Vasconcelos Schaefer

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51108115.5.3001.5515

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.411.931

Apresentação do Projeto:

O projeto foi redigido de forma clara, permitindo a adequada compreensão do estudo, seus objetivos e material e métodos utilizados para atendê-los. Trata-se de estudo em que o Hospital regional de Presidente Prudente (HRPP) é Instituição co-participante. Serão incluídas 20 mulheres, maiores de 18 anos, com diagnóstico de melasma facial, diagnosticado por dermatologista com título de especialista pela Sociedade Brasileira de Dermatologia. As pacientes incluídas deverão estar livres de tratamento para o melasma por, no mínimo 30 dias, podendo estar em uso apenas de protetor solar. Serão realizadas duas biópsias com punch 3 mm na face (aproximadamente 5mm de profundidade) de cada paciente, sendo uma em região com melasma e outra na área com pele sã adjacente (40 fragmentos de pele). As amostras cutâneas serão obtidas no ambulatório de Cosmiatria do Serviço de Dermatologia do Hospital Regional de Presidente Prudente e posteriormente serão levadas à Botucatu (CEVAP-Unesp) para dar seguimento ao preparo para análise proteômica. As amostras serão submetidas então ao processo de espectrometria de massas. Após a espectrometria de massas, os dados serão exportados e submetidos à análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com). O desfecho principal do estudo será a expressão proteica diferencial entre as topografias cutâneas (pele sã e lesada). Há a expectativa da identificação de mais de 400 proteínas em cada amostra.

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, Km 572
Bairro: Bairro Limoeiro **CEP:** 19.067-175
UF: SP **Município:** PRESIDENTE PRUDENTE
Telefone: (18)3229-2077 **Fax:** (18)3229-2080 **E-mail:** cep@unoeste.br

UNIVERSIDADE DO OESTE
PAULISTA - UNOESTE



Continuação do Parecer: 1.411.931

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Identificação diferencial de proteínas expressas na pele com melasma e na pele sã adjacente.

Objetivos específicos:

- Avaliação das vias metabólicas, inflamatórias, estruturais e de crescimento celular indicadas pelas proteínas expressas diferencialmente nas peles com melasma e sã.
- Avaliação das interações entre proteínas identificadas na expressão diferencial nas peles com melasma e sã.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos. Os benefícios são indiretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante e importante. O pesquisador responsável tem adequado conhecimento na área. Foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto: presente e correta.
2. TCLE: presente e adequado.
3. Termo de assentimento: não se aplica.
4. Autorização do responsável pelo local a ser desenvolvida a pesquisa: presente e correta.
5. Autorização de contato com os participantes da pesquisa: presente e correta.
6. Autorização para utilização de prontuários e documentos: não se aplica.
7. Termo de compromisso: presente e correto.
8. Termo de responsabilidade e compromisso: não se aplica.
9. Ofício do HR: presente e correto.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente estudo não fere princípios éticos segundo a resolução CNS 466/2012.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em reunião realizada no dia 16/02/2016, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (CEP-UNOESTE), concordância com o parecerista, considerou o projeto APROVADO. Lembramos que ao finalizar a pesquisa, o (a) pesquisador (a) deverá apresentar o relatório final.

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, Km 572
Bairro: Bairro Limeiro CEP: 19.067-175
UF: SP Município: PRESIDENTE PRUDENTE
Telefone: (18)3229-2077 Fax: (18)3229-2080 E-mail: cep@unoeste.br

UNIVERSIDADE DO OESTE
PAULISTA - UNOESTE



Continuação do Parecer: 1.411.931

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_618258.pdf	18/11/2015 21:52:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	18/11/2015 21:44:32	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoHR2.pdf	18/11/2015 21:17:53	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoHR.pdf	18/11/2015 21:17:32	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaoHR.pdf	18/11/2015 21:17:03	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_618258.pdf	17/11/2015 17:18:08		Aceito
Folha de Rosto	documento.pdf	17/11/2015 17:16:32	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	documento1.pdf	17/11/2015 17:13:40	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	03/11/2015 16:45:23	Luiza Vasconcelos Schaefer	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PRESIDENTE PRUDENTE, 17 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Gisele Alborghetti Nai
(Coordenador)

Endereço: Rua Nelson Nazari, 1000 - Presidente Prudente, SP
Bairro: Bairro Limoeiro CEP: 19.067-175
UF: SP Município: PRESIDENTE PRUDENTE
Telefone: (18)3229-2077 Fax: (18)3229-2080 E-mail: cep@unoeste.br

Página 03 de 03

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNSMS)**

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “Estudo Proteômico do Melasma Facial em Mulheres”, que pretende identificar o diferencial de proteínas expressas na pele com melasma e na pele sã adjacente. O sr(a). foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa por possuir melasma facial.

A pesquisa consta de algumas perguntas sobre idade, tipo de pele, escolaridade, estado civil, profissão, fatores desencadeantes, medicações em uso e local das lesões . Essas perguntas estarão em um questionário impresso a ser respondido no momento da consulta. Além disso, para a pesquisa é necessário realizar biópsia de pele (área com melasma e área sem melasma) que consiste em retirar, sob anestesia local, 2 fragmentos de 3 mm cada, da sua pele na face, utilizando um punch, instrumento próprio para esse fim. Os fragmentos da sua pele serão obtidos tanto da pele com a mancha quanto da pele sadia ao redor (1 fragmentos de cada), para compararmos as regiões. Os locais que serão escolhidos para a biópsia serão de áreas mais periféricas do rosto, poupando o centro da face, que é mais visível. O desconforto da anestesia se restringe à dor e ardência temporários e os riscos da biópsia são infecção local, sangramento discreto e formação de pequena cicatriz. Vale ressaltar que a biópsia não é necessária para o seu tratamento e tem apenas importância para realização deste trabalho. O material de sua biópsia ficará estocado no laboratório de anatomia Patológica do Hospital das Clínicas em Botucatu –UNESP.

O conhecimento dessas características permite esclarecer ainda que não haverá benefícios imediatos para você e que você não será remunerado pela participação nessa pesquisa. Os benefícios serão para a ciência , mais especificamente, para auxiliar a entender as causas 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, assim como interferências trabalhistas. Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo. É garantido total sigilo do seu nome, imagem, resultado de exame ou doença, 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: (18) 3229-2077

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Assinatura: _____ Pesquisador: Luiza Vasconcelos Schaefer tel:

(18) 32221107 e (14) 99673-7769 Rua Francisco machado de Campos , 360 – Presidente Prudente – SP

luizavasconcelos12@hotmail.com

Orientador: Hélio Miot tel: (14)-99671-5656 heliomiot@gmail.com

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Presidente Prudente: Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai End: Rua José Bongiovani, 1297 – Presidente Prudente- SP Telefone : (18) 3229-2077 E-mail: cep@unoeste.br

Comitê de Ética em Pesquisa de Botucatu: End: Chácara Butignoli s/n, Rubião Júnior – Botucatu- SP Telefone : (14) 3880-1609 ou (14) 3880-1608.

Anexo 3. Formulário de dados clínicos e demográficos.

Nome:.....

RG.....

Sexo: M F Data de Nascimento:..... /..... /.....

Telefone para Contato:

Procedência (Cidade):

Naturalidade (Cidade):

Profissão:

Fototipo: I II III IV V VIJá Morou: Praia Sítio/FazendaLocais acometidos: Parotídea Zigoma Temporal Frontal Glabela Mandibular Labial Superior
Mento Nasal Cervical MMSS Colo Orelhas Outro Padrão: Centro-Facial Malar
Mandibular

Início do Melasma: anos de idade

História Familiar de Melasma: Não Sim Quem?Fator desencadeante: ACO Gestação Menopausa TRH Estresse psicológico Infecção OutroTabagismo? Não Sim - (Atual: Não Sim) Usa filtro solar? Não Sim - Qual? Uso diário: Não
Sim Há quanto tempo? Usa ACO? Não Sim – Qual? Há quanto tempo.....

Usa outros medicamentos?

Comorbidades?.....

Gesta:..... Partos: Abortos: