

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

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO β E PROGESTERONA NO MELASMA FACIAL DE
MULHERES E NA PELE SÃ ADJACENTE**

ANDRÉIA DE ALMEIDA TAMEGA

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

BOTUCATU – SP

2014

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

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO β E PROGESTERONA NO MELASMA FACIAL DE
MULHERES E NA PELE SÃ ADJACENTE**

DOUTORANDA: ANDRÉIA DE ALMEIDA TAMEGA

ORIENTADORA: MARIÂNGELA ESTHER ALENCAR MARQUES

**CO-ORIENTADORES: LUCIANE DONIDA BARTOLI MIOT e
HÉLIO AMANTE MIOT**

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

BOTUCATU – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB8/5651

Tamega, Andréia de Almeida.

Expressão gênica e proteica de receptores de estrogênio β e
progesterona no melasma facial de mulheres e na pele sã adjacente /
Andreia de Almeida Tamega. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Mariângela Esther Alencar Marques

Coorientador: Luciane Donida Bartoli Miot

Coorientador: Hélio Amante Miot

CAPES: 40101029

1. Expressão gênica. 2. Estudos transversais. 3. Progesterona. 4. Pele
-Doenças. 5. Distúrbios de pigmentação da pele. 6. Melanose. 7.
Mulheres

Palavras-chave: Melanogênese; Melasma; Pigmentação; Receptor
estrogênio; Receptor progesterona.

Dedicatórias

Aos meus pais, Wilson e Eleonora,

Pelo constante e incansável incentivo, apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Wilson, Daniel e Susana,

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

À Maria Clara e João,

Por me cederem seus pais, Hélio e Luciane, tantas noites. Sem a presença deles ao meu lado, todo esse trabalho não seria possível e não teria o mesmo valor.

Agradecimentos

A Deus, que me garantiu força e coragem para que eu conseguisse alcançar minhas metas.

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

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

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

À Professora Dra. Márcia Guimarães, pelo auxílio e disponibilidade, diante das inúmeras dúvidas técnicas e burocráticas.

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

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

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

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

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

A todos os amigos que ganhei durante a realização das disciplinas e corrida

para obtenção dos créditos.

Enfim, e mais especialmente, aos meus orientadores Mariângela Marques, Luciane Miot e Hélio Miot. A compreensão, o apoio e o incentivo que nunca faltaram, mesmo nos momentos de maior desalento. Carinho, competência e paciência foram fundamentais para que o projeto se realizasse.

Sumário

Índice de abreviaturas	8
1. Revisão da fisiopatogenia do Melasma.....	10
2. Objetivos	31
3. Artigo de investigação.....	32
4. Conclusões	53
5. Perspectivas	54
6. Anexos	56

Índice de abreviaturas

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico.

α -MSH – hormônio estimulante dos melanócitos do tipo α .

ASIP - proteína sinalizadora agouti

bFGF – fator de crescimento básico de fibroblastos.

β -MSH – hormônio estimulante dos melanócitos do tipo β .

cAMP – adenosina monofosfato cíclico.

DCT – dopacromotautomerase.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

DHI – dopa,5,6 diidroxindol.

DHICA - 5,6 Diidroxindol-2-ácido carboxílico.

ET-1 – endotelina-1.

ETBR – receptor de proteína G acoplada.

GM-CSF – fator de estimulação colônias granulócitos-macrófagos.

HGF – fator de crescimento hepático.

HSCORE – escore semiquantitativo de marcação imuno-histoquímica nuclear.

IL-1 – interleucina-1.

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno.

MC1-R – receptor de melanocortina do tipo 1.

MITF – fator de transcrição associado à microftalmia.

MSH – hormônio estimulante dos melanócitos.

NGF – fator de crescimento neural.

PAR-2 – receptor de protease ativada 2.

PG – prostaglandina.

PGE2 – prostaglandina E2.

PGF2 α – prostaglandina F2 α .

PKC – proteína quinase C.

PLC – fosfolipase C.

POMC – proopiomelanocortina.

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro.

RUV – radiação ultravioleta.

SCF – fator de célula tronco.

TYR – tirosinase.

TYRP 1 – proteína 1 relacionada à tirosinase.

TYRP 2 – proteína 2 relacionada à tirosinase.

RUVA – radiação ultravioleta A.

RUVB – radiação ultravioleta B.

UNESP – Universidade Estadual Paulista.

1. Revisão da Fisiopatogenia do Melasma

1.1 Pigmentação da pele

A cor da pele humana normal é efeito da interação de vários pigmentos sendo o principal a melanina, uma proteína acastanhada densa, de alto peso molecular, que assume o aspecto enegrecido quanto mais concentrada estiver. No entanto, contribuem também pigmentos exógenos amarelos, os carotenoides; vermelho, dado pela hemoglobina oxigenada nos capilares da derme; e azul, decorrente da hemoglobina reduzida nas vênulas.¹

Além disso, a pigmentação da pele e do cabelo humanos é dependente do tamanho, número e distribuição de partículas citoplasmáticas denominadas melanossomas, bem como da natureza química da melanina que eles contêm.²

Dois padrões de pigmentação melânica são responsáveis pela cor normal da pele. A cor da pele constitutiva é a cor geneticamente determinada da pele saudável não submetida à exposição crônica à radiação ultravioleta (RUV). A cor da pele facultativa é a cor de pele mais intensa, resultante de exposição solar ou doenças pigmentares, e reflete a capacidade geneticamente determinada de bronzeamento em resposta à RUV.

O grau de “bronzeamento” e de eritema de cada indivíduo após exposição solar, é geneticamente determinado, sendo a base para divisão da pele normal em fototipos (Tabela 1).¹

1.2 Melanócitos

Os melanócitos são células dendríticas, embriologicamente derivadas dos melanoblastos, que se originam da crista neural, logo após fechamento do tubo

neural.³ Sua migração, proliferação e diferenciação em células produtoras de melanina depende de mediadores produzidos no tubo neural, ectoderme e queratinócitos, como a família de glicoproteínas WNT, endotelina 3 e fator de célula tronco (SCF – *stem cell factor*).⁴

Tabela 1. Fototipos de pele segundo a classificação de Fitzpatrick.⁵

Fototipo de pele	Características	Cabelos / olhos
I	Sempre queima, nunca bronzeia	Ruivos/azuis
II	Geralmente queima, às vezes bronzeia	Loiros ou ruivos/verdes ou azuis
III	Às vezes queima, geralmente bronzeia	Castanhos claros /castanhos claros ou azuis ou verdes
IV	Nunca queima, sempre bronzeia	Castanhos/ castanhos ou verdes
V	Moderada pigmentação constitucional	Castanhos ou negros/ Castanhos ou Negros
VI	Marcada pigmentação constitucional	Negros/ Castanhos escuros ou negros

A migração dos melanoblastos da crista neural pode ocorrer para vários destinos. Quando se tornam células completamente desenvolvidas ficam distribuídos em diversos locais: olhos (epitélio pigmentar retiniano, íris e coroide), ouvidos (estrias vasculares), sistema nervoso central (leptomeninges), matriz do pelo, membranas mucosas e pele.²

Na pele, ficam localizados na camada basal da epiderme e projetam seus dendritos através da camada espinhosa onde transferem seus melanossomas aos queratinócitos. Essa associação melanócito-queratinócito é denominada unidade epidérmico-melânica (Figuras 1 e 2) e é constituída por um melanócito e cerca de trinta e seis queratinócitos.⁶ A atividade pigmentar da unidade epidérmico-melânica é regulada por um complexo sistema parácrino.⁴

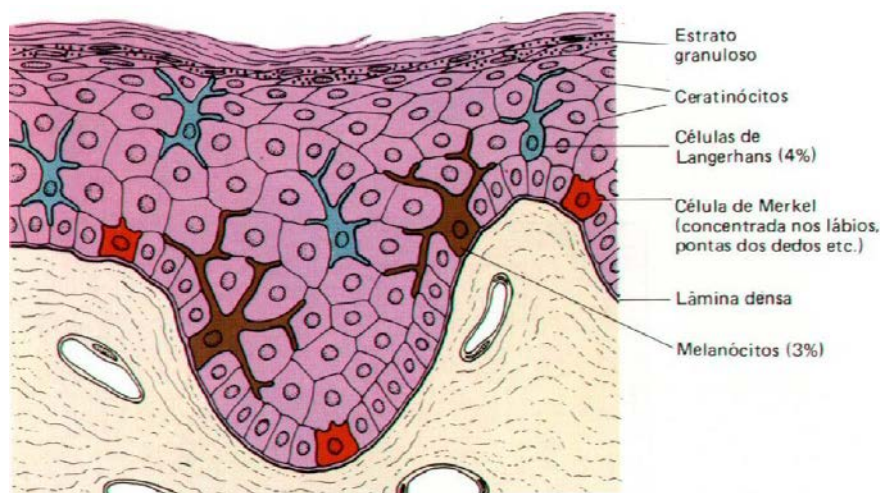


Figura 1. Representação esquemática da disposição dos melanócitos na epiderme e sua inter-relação com os queratinócitos (Fonte: Storm, 2006).⁷

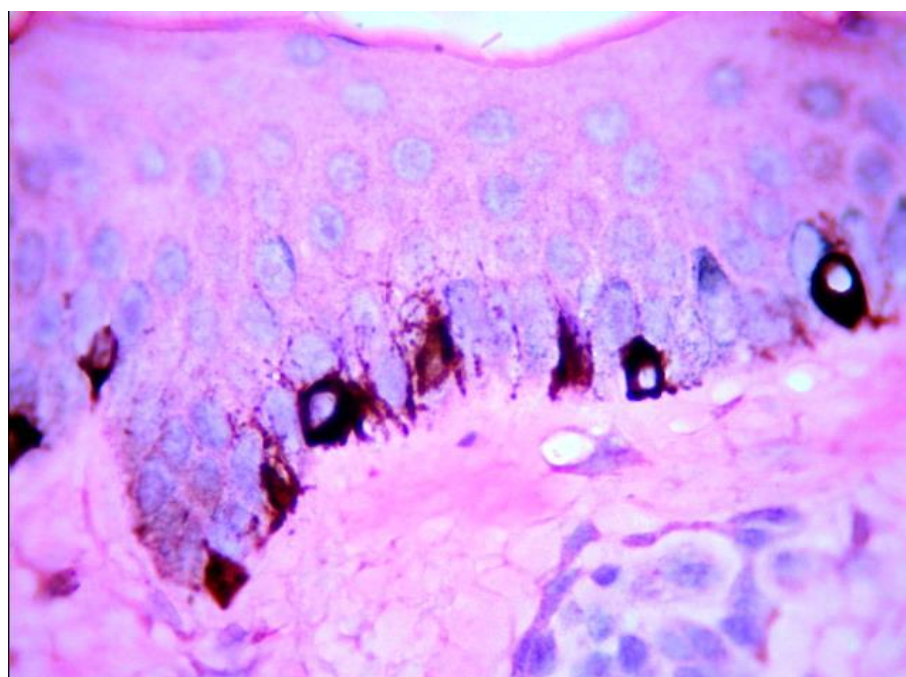


Figura 2. Melanócitos na epiderme marcados pelo Melan-A (40X). Observa-se alta dendricidade e inter-relação com os queratinócitos adjacentes. (Fonte: Arquivo do Departamento de Patologia FMB-UNESP)

As células basais epidérmicas estão unidas às células vizinhas por estruturas específicas denominadas desmossomas e à membrana basal, por

hemidesmosomas. Já os melanócitos, ao contrário, não estão fixos na epiderme. Entretanto, identifica-se apenas, pequeno desnível na posição dos melanócitos em relação ao alinhamento da camada basal, projetando-se, ligeiramente, em direção à derme.⁸

Há em torno de dois mil ou mais melanócitos epidérmicos por milímetro de pele da cabeça e antebraço e usualmente mil no restante do corpo em todas as raças.⁸

O número de melanócitos diminui com a idade, na proporção de 6 a 8% por década, sendo que as diferenças raciais na pigmentação não são devidas a uma marcante diferença no número de melanócitos, mas sim no seu grau de atividade (síntese de melanina e melanossomas), na proporção de feomelanina e eumelanina, suas distribuições nos melanócitos e envolvimento de fatores ambientais como exposição solar, que estimula a síntese de melanina.⁹

1.3 Melanossomas

Melanossomas (figura 3) são organelas elípticas, altamente especializadas, nas quais ocorre a síntese e deposição de melanina através do armazenamento de tirosinase (TYR) sintetizada pelos ribossomos. São sede dos fenômenos bioquímicos que originam a melanina.¹ A síntese de melanina ocorre, exclusivamente, nos melanossomas e é dependente de vários genes como TYR, gene da proteína-1 relacionada à tirosinase (TYRP1), OCA2, gene receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R) e gene da proteína sinalizadora agouti (ASIP).

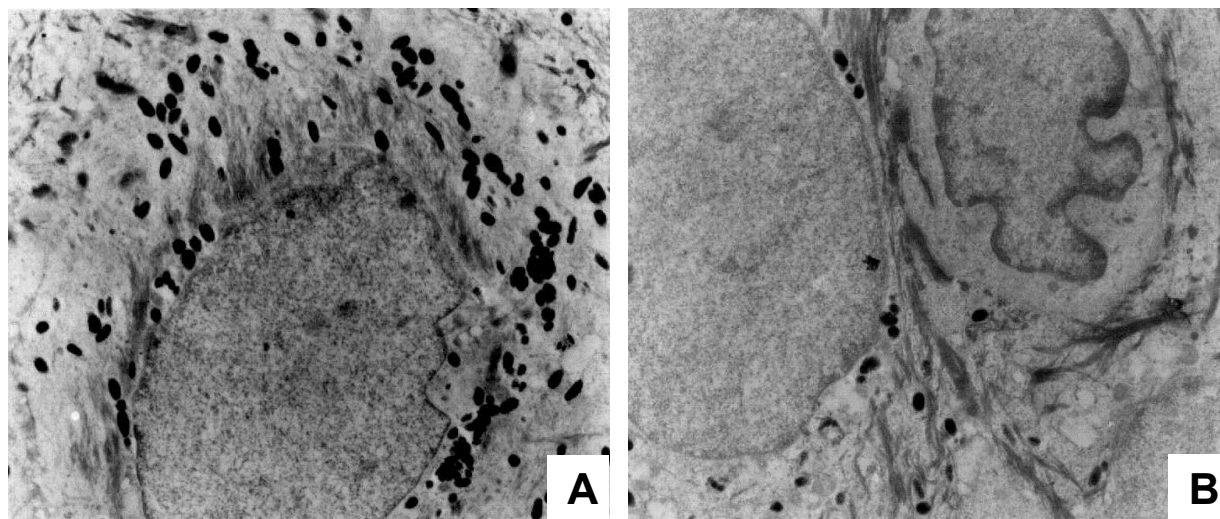


Figura 3 - Eletrofotomicrografia de pele acometida por melasma evidenciando queratinócito (Figura A) e melanócito (Figura B) repletos de melanossomas maduros (7000X). (Fonte: Arquivo do Departamento de Patologia FMB-UNESP)

Nos indivíduos negros os melanossomas são maiores (mais maduros) do que em brancos e são armazenados mais como unidades do que como grupamentos. A degradação dos melanossomas maiores nos queratinócitos também é retardada, o que também contribui para os níveis mais altos de pigmentação cutânea.²

1.4 Melanina

Nos melanossomas da pele normal, a melanina é extremamente densa, sendo um polímero nitrogenado, insolúvel e de alto peso molecular. A melanina é um pigmento que além de dar cor à pele, desempenha função protetora, absorvendo a RUV.⁸

O elemento inicial do processo biossintético da melanina é a L-tirosina, um aminoácido essencial. A L-tirosina sofre atuação química da TYR, complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado nos ribossomos e transferido através do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, sendo aglomerado em unidades

envoltas por membrana, ou seja, o melanossoma.⁸

Em presença de oxigênio molecular, a TYR oxida a L-tirosina em L-dopa (dioxifenilalanina) e esta, em dopaquinona (Figura 4). A tirosina hidroxilase isoforma I está presente na membrana do melanossomo, adjacente à TYR, e catalisa a conversão da L-tirosina em L-dopa, promovendo a ativação da TYR.⁴ A partir da formação da dopaquinona, a presença ou ausência de cisteína determina o rumo da reação para síntese de eumelanina ou feomelanina.¹⁰

Na ausência de cisteína (glutathione), a dopaquinona é convertida em ciclodopa (leucodopacromo) e esta em dopacromo. Há duas vias de degradação de dopacromo, uma que forma dopa,5,6 diidroxiindol (DHI) em maior proporção e outra que forma 5,6 diidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) em menor quantidade. Finalmente, estes diidroxiindóis são oxidados à eumelanina. Este processo é catalisado pela dopacromotautomerase (DCT).

A proteína-1 relacionada à tirosinase (TYRP 1) é que parece estar envolvida na ativação e estabilização da TYR, síntese de melanossomos, aumento da relação eumelanina/ feomelanina. A proteína-2 relacionada à tirosinase (TYRP 2) atua como a DCT.

Por outro lado, na presença de cisteína, dopaquinona rapidamente reage para gerar 5-S-cisteinildopa e, em menor proporção, 2-S-cisteinildopa. Cisteinildopas são então oxidadas em intermediários benzotiazínicos e finalmente produzem feomelanina (Figura 4).⁴

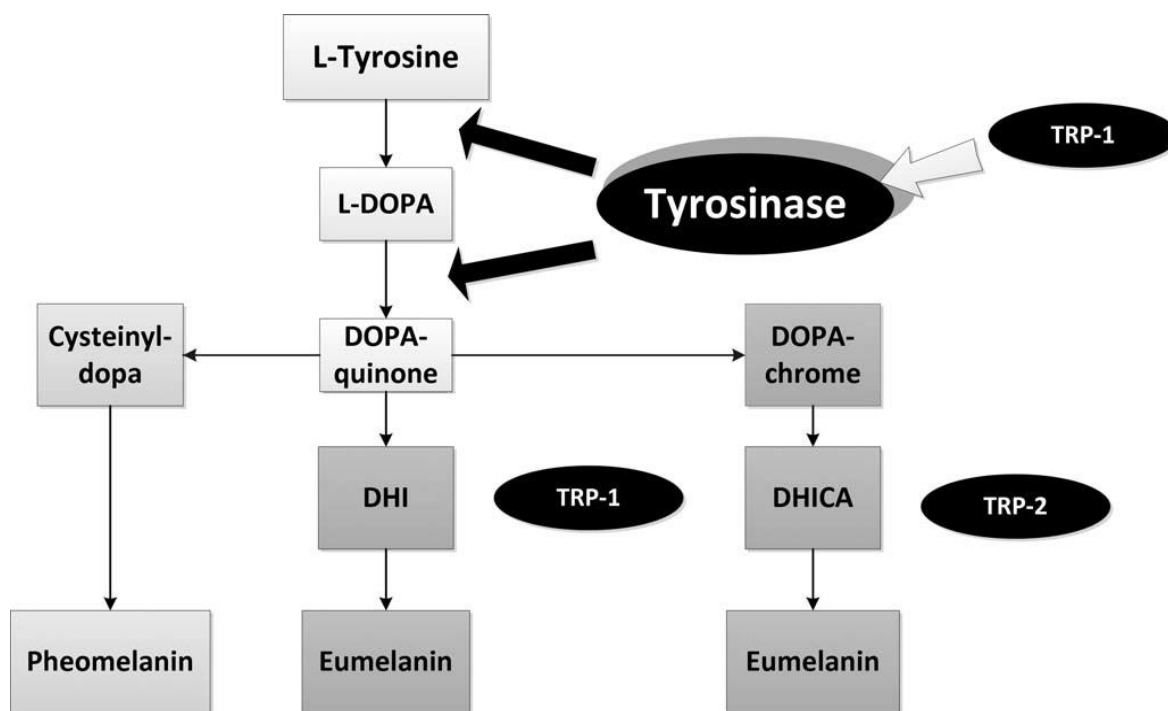


Figura 4. Esquema da formação da eumelanina e feomelanina.⁴

Eumelanina, um polímero marrom, alcalino e insolúvel, é o tipo predominante em indivíduos de cabelos e olhos escuros, sendo mais eficiente na fotoproteção. Feomelanina, um pigmento alcalino, solúvel e amarelo-esverdeado, é predominantemente encontrada em indivíduos de cabelos vermelhos e fototipos I e II.⁴

Pigmentos semelhantes à feomelanina, no entanto, podem ser estruturalmente derivados da eumelanina, assim como esta pode ser oxidada, na presença de íons metálicos, resultando em um pigmento solúvel e mais claro. Outro pigmento sulfurado, derivado da feomelanina, pode ser encontrado em pequenas quantidades nos cabelos humanos vermelhos e é denominado tricromo.⁶

Sendo assim, a melanogênese apresenta três passos distintos e importantes. O passo inicial é a produção de cisteinildopa, a qual continua tão intensa quanto for a quantidade de cisteína presente.

O segundo passo é a oxidação da cisteinildopa para formar feomelanina, processo que se propaga de acordo com a quantidade de cisteinildopa presente. E o terceiro e último passo é a produção de eumelanina, a qual começa somente após a maioria da cisteinildopa ser depletada. Entretanto, parece que a eumelanina se deposita sobre a feomelanina pré-formada e a relação entre feo e eumelanina é determinada pela atividade da TYR e disponibilidade de cisteína.¹⁰

A eumelanina absorve e dispersa a luz ultravioleta, atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol.⁹ Em outras palavras, indivíduos com maior pigmentação tendem a se queimar menos e bronzeiam mais do que indivíduos mais claros.¹¹

Após a síntese completa da melanina, os melanossomas repletos de melanina são injetados no interior do citoplasma dos queratinócitos da unidade epidérmico-melânica correspondente, através dos prolongamentos dendríticos do melanócito. Essa transferência não é completamente esclarecida, e diferentes mecanismos como exocitose, citofagocitose, fusão das membranas plasmáticas e transferência das vesículas são descritos.⁴

O receptor de protease ativada 2 (PAR-2) é expresso nos queratinócitos, porém não nos melanócitos. PAR-2 está envolvido na transferência dos melanossomas e, portanto, deve regular a pigmentação. Ativação PAR-2 com tripsina ou com peptídeo agonista SLIGRL, induz pigmentação em coculturas de queratinócitos e melanócitos, mas não em coculturas que foram separadas espacialmente, indicando a necessidade de contato queratinócito-melanócito.¹²

SLIGRL, peptídeo agonista PAR-2, aumenta a transferência de melanossomas pelos queratinócitos e, conseqüentemente, aumenta a pigmentação de depósito. Diferentemente, RWJ-50353, inibidor da protease, leva à redução da pigmentação

de depósito nos melanócitos e consequente despigmentação.¹²

Uma vez no interior dos queratinócitos, os melanossomas tendem a distribuir-se sobre a parte superior do núcleo dos queratinócitos basais, como um “chapéu” (Figura 5), de forma a protegê-lo das radiações ultravioleta. Sugere-se que o pigmento no interior destas células atua, também, como varredor de radicais livres fotoproduzidos, sempre no sentido de proteger o DNA celular.³

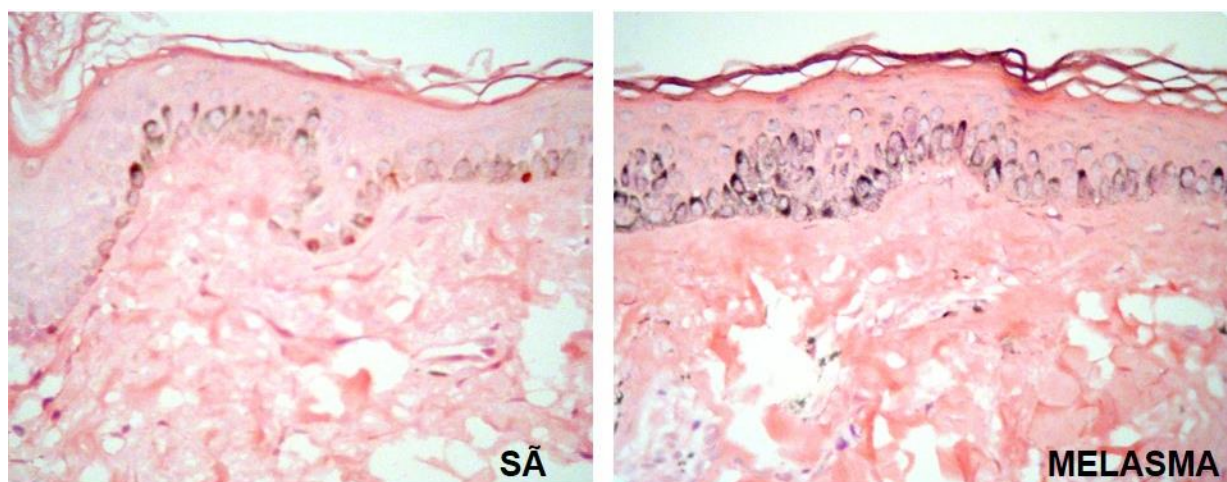


Figura 5. Comparação da quantidade de melanina entre as epidermes da pele sã e do melasma. Observa-se denso acúmulo supranuclear nos queratinócitos basais (Fontana-Masson, 40x). (Fonte: Arquivo do Departamento de Patologia FMB-UNESP)

1.5 Receptor de Melanocortina do tipo 1 (MC1-R) e Hormônio estimulante dos melanócitos do tipo α (α -MSH)

Os receptores de melanocortina pertencem à família dos receptores das proteínas G. MC1-R predomina nos melanócitos, e seus agonistas incluem hormônio estimulante dos melanócitos do tipo α (α -MSH) e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), ambos produtos de clivagem da proopiomelanocortina (POMC). POMC

também é expressa e sofre clivagem em outros locais, incluindo o cérebro e a pele. O α -MSH foi o primeiro dos peptídeos derivados da POMC a ser identificado na pele.¹³

O ACTH e o α -MSH possuem em comum o tetrapeptídeo His-Phe-Arg-Trp, que é essencial para a atividade melanotrópica. Este peptídeo é o principal regulador intrínseco da pigmentação, porém sua produção pituitária é insuficiente para estimular a melanogênese, assim, os melanócitos e queratinócitos são os principais responsáveis por sua produção na pele e controle da melanogênese.¹⁴⁻¹⁶

Injeções nos indivíduos humanos de α -MSH e β -MSH (hormônio estimulante dos melanócitos do tipo β) levam a um escurecimento da pele que resulta da elevada melanogênese dentro dos melanócitos epidérmicos e aumento do transporte dos melanosomas derivados de melanócitos, através dos ceratinócitos, sem a necessidade de exposição à RUV. A hiperpigmentação cutânea foi também observada quando indivíduos humanos foram injetados com altas doses de ACTH.^{8,17-19}

Evidências indicam que estes hormônios têm um papel parácrino na regulação das funções dos melanócitos. Mais de 120 genes foram identificados e parecem regular a pigmentação, porém, os efeitos do α -MSH são mediados pelo MC1-R, o qual é expresso na superfície dos melanócitos e é considerado o ponto chave para pigmentação.

MC1-R está também presente em outras células como monócitos, neutrófilos, células de glioma, astrócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. Desde que MC1-R tem uma distribuição tecidual ampla, é provável estar associado com um número grande de funções biológicas.^{8,14,20-26}

Polimorfismos genéticos do MC1-R são responsáveis por diferenças étnicas da pigmentação constitucional e por diferentes respostas à RUV.^{16,27} Em pessoas de cabelos vermelhos e pele clara, há alta incidência de mutações do MC1-R, o que deve ser responsável pela diminuição da resposta ao α -MSH, resultando em menor eumelanogênese e reduzida pigmentação induzida por exposição à RUV.¹⁶

A proteína de sinalização agouti, embora pobremente documentada, é o único antagonista conhecido do MC1-R, compete com α -MSH e, portanto, estimula a feomelanogênese.⁴

1.6 Estresse e Melanogênese

O complexo queratinócito-melanócito responde rapidamente a uma gama de estímulos ambientais, de maneira parácrina e/ou autócrina. Assim, os melanócitos respondem à RUV, proteína de sinalização agouti, hormônio estimulante dos melanócitos (MSH), endotelinas, fatores de crescimento, citocinas, e estímulos inflamatórios.

Depois da exposição à RUV, e em dependência da expressão do p53, os melanócitos aumentam a expressão de POMC, do precursor de MSH, do receptor de melanocortina 1 (MC1-R), TYR e TYRP1, da proteína quinase C (PKC), e outros fatores de sinalização. Sabe-se, também, que a RUV estimula a produção de endotelina-1 (ET-1) e POMC por queratinócitos e que esses fatores podem então, agir de uma forma parácrina para estimular os melanócitos.

Além de queratinócitos e fibroblastos, possivelmente outras células da pele, produzem citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que podem aumentar a produção de melanina e/ou estimular a transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos. Fatores de crescimento do melanócito afetam

não só o seu crescimento e pigmentação dos melanócitos, mas também a sua forma, dendricidade, adesão às proteínas da matriz, e mobilidade.²⁸ (Figura 6)

O α -MSH, ACTH, fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento neural (NGF), endotelinas, fator de estimulação colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator inibidor de leucemia, fator de crescimento hepático (HGF) são fatores derivados dos queratinócitos que também parecem estar envolvidos na regulação da proliferação e/ou diferenciação dos melanócitos.²⁹ Também o aumento na expressão do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) induz o aumento da regulação do TYR, TYRP1 e DCT que também resulta na síntese de melanina.³⁰

Os queratinócitos também produzem e liberam NGF, que está envolvido na regulação da melanogênese e/ou dendricidade dos melanócitos. A produção e liberação deste fator de crescimento é estimulada pela RUV, sugerindo outra influência parácrina dos queratinócitos nos melanócitos com possível relevância na resposta ao bronzamento, uma vez que foi demonstrado que melanócitos expressam receptores de NGF.³¹

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 à RUV. O efeito global da ET-1 é o aumento da dendricidade dos melanócitos e o aumento da migração e melanização dos melanócitos.

A ligação da ET-1 ao seu receptor de proteína G-acoplada (ETBR) nos melanócitos ativa uma cascata de vias de sinalização, que resulta na mobilização do cálcio intracelular, ativação de PKC, elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).³²

A RUV estimula os queratinócitos a produzirem ET-1 e também induz a interleucina-1 (IL-1) na produção destas células. IL-1 é conhecido por induzir a ET-1 em queratinócitos numa forma autócrina. Sugere-se que estes eventos intracelulares levam ao aumento na TYR, proteínas e atividade enzimática em melanócitos vizinhos, bem como a um aumento no número de melanócitos.³³ (Figura 6)

As prostaglandinas E2 e F2 α (PGE2 e PGF2 α) são conhecidas por serem produzidas e liberadas a partir de queratinócitos humanos pela estimulação do PAR-2. PGE2 e PGF2 α estimulam a dendricidade de melanócitos epidérmicos humanos em cultura.³⁴

O bFGF e SCF também são expressos pelos queratinócitos. Estes fatores estão envolvidos na regulação da proliferação e melanogênese/dendricidade de melanócitos epidérmicos humanos em pele normal e/ou em pele irradiada por radiação ultravioleta A (RUVA) e radiação ultravioleta B (RUVB).^{35,36}

O HGF se liga ao seu receptor específico e ativa MAPK, provocando o aumento da regulação de proteínas necessárias para a proliferação de melanócitos.³⁷

A epiderme tem uma rede complexa que tanto secreta quanto responde às citocinas autócrinas e parácrinas produzidas por queratinócitos e melanócitos.²⁸

1.6 Melasma

Melasma é uma disfunção da melanogênese em humanos e constitui uma discromia adquirida comum que afeta simetricamente as áreas fotoexpostas. É crônico e recidivante, apesar da terapêutica. Possui importante impacto na vida social, familiar e profissional dos pacientes.^{39,40}

Embora possa acometer ambos os sexos e todas as raças, é mais comum em

mulheres jovens em idade fértil. Ocorre principalmente em indivíduos de origem oriental ou hispânica vivendo em regiões de clima tropical.

A principal faixa etária de aparecimento é de 30-55 anos e o sexo masculino representa apenas 10% dos casos.⁴¹⁻⁴³ Incide principalmente entre fenótipos mais pigmentados (Fitzpatrick III a V), entretanto a doença aparece mais precocemente em pacientes menos pigmentados (Fitzpatrick II e III). Também acomete mais precocemente indivíduos com antecedente familiar positivo para melasma.⁴⁴

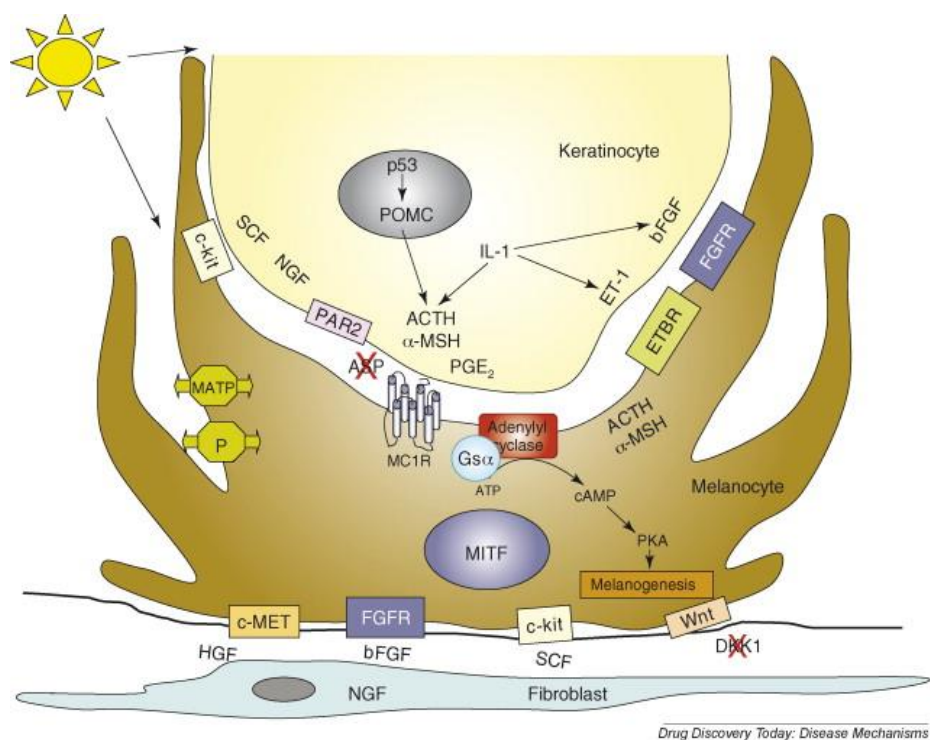


Figura 6. Esquema da resposta do melanócito-queratinócito aos estímulos ambientais, parácrinos e autócrinos.³⁸

A história natural do melasma ainda não foi adequadamente estudada. As casuísticas evidenciam importante redução da prevalência após os 50 anos de idade o que pode se dever à menopausa e à própria redução do número e atividade melanocítica que ocorre com o envelhecimento.^{4,39}

Caracteriza-se por máculas hiperocrômicas acastanhadas, de diversas tonalidades, simétricas e irregulares, na face e áreas fotoexpostas.⁴¹⁻⁴³

Geralmente ocorre em um de três padrões clínicos. O mais comum é o centro-facial, enquanto os tipos menos comuns são o malar e mandibular.⁴⁵

O padrão centro-facial consiste de lesões na fronte, bochechas, nariz, região supralabial e mento. O padrão malar descreve lesões localizadas nas bochechas e dorso nasal. O mandibular possui lesões nos ramos mandibulares.

A designação como centrofacial, malar e mandibular não leva em conta as formas periférica e combinadas.⁴⁶⁻⁴⁸ Um estudo identificou uma predominância de melasma padrão centro-facial, sem nenhuma evidência para apoiar um padrão exclusivamente mandibular, tal como sugerido por alguns autores.⁴⁹ Neste estudo, 64,8% de incidência mandibular co-ocorreu com topografia parótida e somente dois casos (3,7%) se apresentaram apenas com lesões mandibulares.⁵⁰

O padrão mandibular deve ser, na verdade, uma forma de poiquilodermia de Civatte, já que as pacientes são frequentemente menopausadas e biópsias cutâneas revelaram significativo dano actínico.⁴⁹

Inúmeros fatores estão associados ao início da doença, porém nenhum deles pode ser responsabilizado isoladamente pelo seu desenvolvimento.

Gravidez, terapias hormonais, contraceptivos orais, cosméticos, drogas fototóxicas, endocrinopatias, estresse emocional, inflamações da pele e medicações anticonvulsivantes são elementos referidos pela literatura. Entretanto, a predisposição genética e exposição às radiações solares configuram os fatores mais importantes para seu desenvolvimento, já que a doença se manifesta principalmente após períodos de maior exposição à luz solar, como no verão.^{28,47,51}

Os melasmas associados à gestação, em regra, costumam desaparecer

completamente em um prazo de até um ano após o parto, todavia, até 30% das pacientes evoluem com alguma sequela pigmentar. O quadro é mais persistente em mulheres que fizeram uso de anticoncepcionais orais e nos melasmas com pigmentação mais intensa. Recorrências são comuns em gestações subsequentes e as chances de se apresentar melasma pela primeira vez durante uma gravidez aumentam com história de gestações múltiplas.⁵²⁻⁵⁶

Histopatologicamente, observa-se, na pele com melasma, uma hipertrofia melanocítica localizada, sem aumento no número dos melanócitos, porém com aumento do número e maturidade dos melanossomas; hiperpigmentação melânica de todas as camadas da epiderme e elastose solar.^{20,43,57} A pigmentação dérmica não difere na epiderme com melasma e na pele sã adjacente.^{43,58,59}

Vários peptídeos como SCF, ET-1, bFGF, HGF, IL- 1, PGE2 e α -MSH, agem como mitógenos ou melanógenos. São produzidos por queratinócitos, melanócitos e fibroblastos; interferindo na melanização epidérmica e podem exercer algum papel na gênese da doença.^{8,20,22,60,61}

A prevalência no sexo feminino, durante a menacme, e o surgimento das lesões após a introdução de contraceptivos orais, gravidez e terapia de reposição hormonal, corroboram o papel de hormônios sexuais na fisiopatologia da doença. Em contrapartida, níveis séricos de estrogênio não estão aumentados nessa população, o que sugere o possível aumento da expressão de seus receptores como base da resposta melanogênica.⁶²

1.7 Estrogênios

Os estrogênios aumentam a vascularização da pele e suprimem a atividade da glândula sebácea, além de aumentar a atividade das células pigmentantes.⁴⁵

Estudos já demonstraram que culturas de melanócitos humanos expressam receptores de estrogênio e que o estradiol aumenta os níveis de TYR, TYRP 1 e TYRP 2, enzimas envolvidas na eumelanogênese humana, dentro dos melanócitos humanos normais.⁴⁵

Um estudo indiano comparou FSH, LH, prolactina, estrogênio e progesterona entre 36 mulheres com melasma e controles da mesma idade. Houve diferença nos níveis de 17- β -estradiol no início do ciclo menstrual entre os grupos, sugerindo que estrogênios possam ser fatores de risco e mantenedores da doença.⁶³

Nos queratinócitos, o 17- β -estradiol pode atuar por vias de sinalização genômica (através de receptor estrogênico) e não genômica.(Figura 7).²⁸

Há duas formas de receptores de estrogênios. Descoberto na década de 1960, o receptor de estrogênio α tem sua importância ligada ao câncer de mama. Em 1986, uma nova forma de receptor de estrogênio, receptor de estrogênio β , foi descoberta, e com isto abriu novos campos de pesquisa sobre o estrogênio.⁶⁴

Classicamente, os estrogênios se ligam a receptores específicos, os quais estão localizados no núcleo das células alvo, juntamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA). Quando o estrogênio se liga ao seu receptor, ele altera sua forma, sendo que o complexo estrogênio-receptor se liga a sítios específicos do DNA, causando ativação de certos genes e levando à produção de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e proteínas específicas.⁶⁵

Embora estruturalmente os dois tipos de receptores sejam semelhantes, uma vez que o estrogênio se liga a um deles, eles podem resultar em diferentes efeitos. Em certos sítios de ligação, eles podem até mesmo terem efeitos opostos, isto é, ativação da transcrição quando o estrogênio se liga ao receptor α e inibição da transcrição ao se unir ao receptor β .⁶⁵

Os sítios de ligação aos dois receptores possuem 60% de homologia em sua estrutura, assim, alguns ligantes terão diferentes afinidades de ligação aos receptores α e β .^{61,65}

Estrona e 17- α -estradiol possuem maior afinidade de ligação ao receptor α .⁶¹ O 17- β -estradiol aumenta os níveis de RNAm do MC1-R, portanto, pode exercer papel importante na pigmentação cutânea e no melasma, já que o MC1-R é um dos pontos fundamentais na via para produção de melanina.⁶⁶

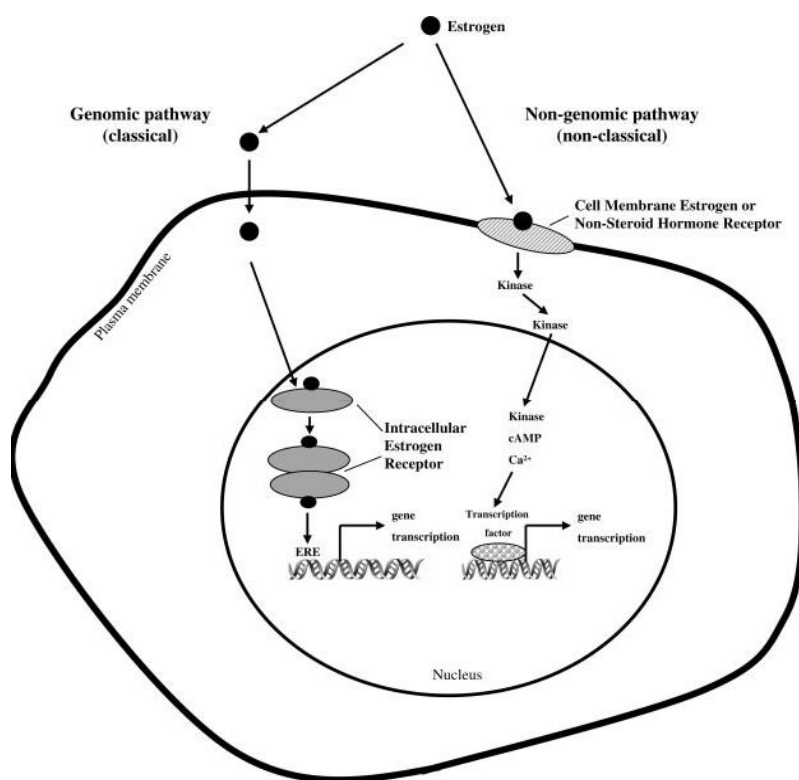


Figura 7. Vias de Sinalização do 17- β -estradiol.²⁸

1.7 Progesterona

Alguns estudos evidenciaram que a progesterona aumenta o número de células e a atividade da TYR em melanócitos, enquanto outros evidenciaram significantes efeitos inibitórios da progesterona na proliferação de melanócitos em

culturas.⁶⁶⁻⁶⁸

Progesterona é marcadamente elevada na gravidez, o que pode justificar o surgimento de melasma nessa fase, via ativação dos receptores epidérmicos. Porém, alguns grupos de progestágenos, como a clormadinona, podem contrabalançar o efeito estrogênico na pigmentação, protegendo contra o desenvolvimento do melasma.^{68,69}

Sendo assim, a relação da progesterona na pigmentação melânica ainda não é definida e, portanto, seu verdadeiro papel no desenvolvimento do melasma não pode ser estabelecido.

Referências bibliográficas

1. Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP, Hori Y. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF Dermatology in General Medicine. New York: Mcgraw-Hill; 1999:936-44.
2. Sulaimon SS, Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol* 2003;14:57-65.
3. Boissy RE. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatol Clin* 1988;6:161-73.
4. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis*. *An Bras Dermatol* 2013;88:76-83.
5. Fitzpatrick TB. Soleil et peau. *J de Medecine Esthetique* 1975;2:33-4.
6. Bleehen SS, Ebling FJG, Champion RH. Disorders of Skin Color. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FJG Eds *Rook / Wilkinson / Ebling textbook of Dermatology*. Oxford: Blackwell Scientific publications; 1992:1561-2.
7. Storm CA, Elder DE. Pele. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Swarting R, Strayer D *Patologia: Bases clínico-patológicas da medicina*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2006:1224-91.
8. Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick TB, Protá G. Biology of Melanocytes. . In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF *Dermatology in General Medicine*. New York: Mcgraw-Hill; 1999:192-220.
9. Jones K, Hughes J, Hong M, Jia Q, Orndorff S. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res* 2002;15:335-40.
10. Ito S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 2003;16:230-6.
11. Wagner JK, Parra EJ, H LN, Jovel C, Shriver MD. Skin responses to ultraviolet radiation: effects of constitutive pigmentation, sex, and ancestry. *Pigment Cell Res* 2002;15:385-90.
12. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, et al. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 2000;254:25-32.
13. Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 1998;11:265-74.
14. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007;445:843-50.
15. Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1094-104.
16. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 2002;50:125-33.

17. Wickelgren I. Skin biology. A healthy tan? *Science* 2007;315:1214-6.
18. Barsh G, Attardi LD. A healthy tan? *N Engl J Med* 2007;356:2208-10.
19. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004;84:1155-228.
20. Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res* 2005;571:133-52.
21. Rouzaud F, Hearing VJ. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides* 2005;26:1858-70.
22. Bastiaens M, ter Huurne J, Gruis N, et al. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. *Hum Mol Genet* 2001;10:1701-8.
23. Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I, et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000;13 Suppl 8:156-62.
24. Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:217-29.
25. Voisey J, Carroll L, van Daal A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets* 2003;4:586-97.
26. Prusis P, Frandberg PA, Muceniece R, Kalvinsh I, Wikberg JE. A three dimensional model for the interaction of MSH with the melanocortin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:205-10.
27. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1493-506.
28. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J* 2007;21:976-94.
29. Hirobe T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res* 2005;18:2-12.
30. Tachibana M. MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res* 2000;13:230-40.
31. Yaar M, Grossman K, Eller M, Gilchrist BA. Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J Cell Biol* 1991;115:821-8.
32. Imokawa G, Yada Y, Kimura M. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J* 1996;314 (Pt 1):305-12.
33. Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol* 1995;105:32-7.
34. Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, Lapoint R. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol* 2004;122:1214-24.
35. Halaban R, Langdon R, Birchall N, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* 1988;107:1611-9.
36. Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, Takema Y, Imokawa G. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 2001;116:578-86.
37. Matsumoto K, Tajima H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:45-51.
38. Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech* 2008;5:e189-e99.
39. Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. [Physiopathology of melasma]. *An Bras Dermatol* 2009;84:623-35.
40. Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML, et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol* 2006;156 Suppl 1:13-20.
41. Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int J Dermatol* 1998;37:897-903.
42. Guevara IL, Pandya AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and a fluorinated steroid. *Int J Dermatol* 2001;40:212-5.
43. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002;146:228-37.
44. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol* 2013;[ahead of print].
45. Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing:

an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol* 1998;139:444-52.

46. Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm MC, Jr. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol* 1981;4:698-710.
47. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995;131:1453-7.
48. Victor FC, Gelber J, Rao B. Melasma: a review. *J Cutan Med Surg* 2004;8:97-102.
49. Mandry Pagan R, Sanchez JL. Mandibular melasma. *P R Health Sci J* 2000;19:231-4.
50. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2013;27:151-6.
51. Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1998;139:932.
52. Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2009;23:1254-62.
53. Moin A, Jabery Z, Fallah N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy. *Int J Dermatol* 2006;45:285-8.
54. Resnik S. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *J Am Med Assoc* 1967;199:601-5.
55. Alves GF, Nogueira LSC, Varella TCN. Dermatology and pregnancy *Dermatologia e gestação. An Bras Dermatol* 2005;80:179-86.
56. Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 2005;27:96-101.
57. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol* 2006;154:1094-9.
58. Miot LD, Miot HA, Poletti J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol* 2010;32:676-82.
59. Hernandez-Barrera R, Torres-Alvarez B, Castanedo-Cazares JP, Oros-Ovalle C, Moncada B. Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol* 2008;33:305-8.
60. Prusis P, Schioth HB, Muceniece R, et al. Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide. *J Mol Graph Model* 1997;15:307-17, 34.
61. Lieberman R, Moy L. Estrogen receptor expression in melasma: results from facial skin of affected patients. *J Drugs Dermatol* 2008;7:463-5.
62. Sacre RC, Fernandes NC, Vaisman M, Tendrich M. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. *An Bras Dermatol* 1996;71:195-8.
63. Hassan I, Kaur I, Sialy R, Dash RJ. Hormonal milieu in the maintenance of melasma in fertile women. *J Dermatol* 1998;25:510-2.
64. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-65.
65. Jee SH, Lee SY, Chiu HC, Chang CC, Chen TJ. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:1407-12.
66. Im S, Lee ES, Kim W, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes. *J Korean Med Sci* 2002;17:58-64.
67. Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol* 2002;146:165-7.
68. Wiedemann C, Nagele U, Schramm G, Berking C. Inhibitory effects of progestogens on the estrogen stimulation of melanocytes in vitro. *Contraception* 2009;80:292-8.
69. Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res* 2007;39:85-95.

2. Objetivos

Comparar a expressão proteica e gênica de receptores de estrógeno β e de progesterona na pele com melasma e pele normal adjacente.

3. Texto principal

Artigo de investigação no formato do JEADV

Title: Gene and protein expression of β estrogen and progesterone in facial melasma and adjacent healthy skin in women.

Running head: estrogen and progesterone receptors in melasma.

Autores:

Tamega, Andréia de Almeida (1)

Miot, Hélio Amante (1)

Moço, Natália Prearo (2)

Silva, Márcia Guimarães (2)

Marques, Mariângela Esther Alencar (2)

Miot, Luciane Donida Bartoli (1)

(1) Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina UNESP Botucatu, São Paulo, Brasil. Campus Universitário de Rubião Jr. 18618-970. Botucatu – SP – Brasil

(2) Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina UNESP Botucatu, São Paulo, Brasil. Campus Universitário de Rubião Jr. 18618-970. Botucatu-SP-Brasil.

Instituição onde o trabalho foi desenvolvido:

Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina UNESP Botucatu e Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina UNESP Botucatu.

Corresponding author:

Luciane Donida Bartoli Miot

Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Unesp, S/N.
Campus Universitário de Rubião Jr.

18618-970 – Botucatu SP – Brazil

E-mail: lucianemiot@fmb.unesp.br

FONE/FAX: +55 14 3882 4922

Funding sources:

This work was funded by FAPESP (Process nº. 2009/53571-0)

Conflict of interest disclosure: None.

ABSTRACT:

BACKGROUND: Melasma is an acquired, chronic hypermelanosis which affects photoexposed areas and inflicts important psycho-social impact. Its physiopathology is not well understood. Women are mainly affected and lesions usually develop after the introduction of oral contraceptives, pregnancy and hormone replacement therapy, these are elements that suggest the influence of sexual hormones in the disease's development.

OBJECTIVE: Comparing gene and protein expression for β estrogen and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin.

METHODS: A transversal study including 42 women with facial melasma, at the Dermatology Service in UNESP Medical School, Botucatu-SP, Brazil. Biopsies from lesional skin were performed as well as from the healthy skin around it. Gene expression (PCR real time) from the hormone receptors in the tissue was evaluated. Subsequently, skin fragments were immuno-marked to β estrogen and progesterone nuclear receptors, evaluated according to their HSCORE (epidermis) and percentage of staining by microscopic field (dermis).

RESULTS: RNAm tissue expression for β estrogen and progesterone receptor was not different between melasma affected skin fragments and the healthy parts around

it ($p>0.2$). Nuclear epithelial expression for β estrogen and progesterone's receptors were higher in lesional skin (HSCORE 144.5 and 60.7) than in the healthy skin around it (HSCORE 98.8 and 27.8; $p<0.05$), without any difference on dermal markings. Nuclear histological expression for β estrogen or progesterone were not influenced by age, phototype, family background, age when it first appeared, clinical pattern, disease induced by pregnancy or contraceptive pills.

CONCLUSION: There was no difference in gene expression for β estrogen and progesterone receptors in melasma affected skin in comparison to adjacent healthy skin. However, there was a higher protein expression of such receptors in melasma affect epithelia, suggesting hormonal participation in the diseases' pathogenesis.

KEY WORDS: melasma, estrogen receptor, progesterone receptor, pigmentation, melanogenesis, immuno-histochemical, melanin, melanocytes.

INTRODUCTION

Melasma is a common acquired dyschromia which symmetrically affects photo exposed areas. It is chronic and relapsing, besides treatment. It is caused by local melanogenesis' increase, and inflicts important impact over patient's social, family and professional life. [1,2]

Although it can affect both gender and all races, it is much more common in young women in their childbearing age. It mostly occurs in eastern or Hispanic individuals, living in tropical areas. The main affected age group is 30-55 years old and men represent only 10% of it. [3-5]

Many factors are associated to the beginning of the disease. However, none of them can be exclusively responsible by the development of the disease.

Pregnancy, hormonal therapies, oral contraceptives, cosmetics, phototoxic drugs, endocrinopathies, emotional stress and anticonvulsant medication are elements cited in literature. However, genetic predisposition and solar radiation exposition are the most important factors to its development, once the disease mainly appears after long sun light exposition periods, such as in summer. [6-9]

Its prevalence in females, during menacme, and the formation of lesions after oral contraceptive introduction, pregnancy and hormonal replacement therapy, corroborate sexual hormones' role in the disease's physiopathology. On the other hand, estrogen serum levels are not increased in this population. [7,10] It suggests a possible increase of its receptors' expression, as the basis for the melanogenic response.

There are two estrogenic receptor forms: α receptor is importantly linked to breast cancer, and β receptor that is expressed in epidermis. [11] Regarding keratinocyte, 17- β -estradiol can act through genomic and non genomic signaling. [9] Estrogens increase skin vascularization and suppress sebum genesis, besides increasing pigmentation cells activity. [12] 17- β -estradiol increases RNAm levels of type 1 melanocortin receptors (MC1-R), so it can play an important role in skin pigmentation and in melasma. [13]

Progesterone role in melanic pigmentation is not defined yet. So studies showed that progesterone increases the amount of cells and tyrosinase's activities in melanocytes, whereas others have evidenced significant progesterone inhibitory effects in melanocyte cultures' proliferation. [14,15]

The current study aims to evaluate gene and protein expression for β estrogen and progesterone receptors in skin affected by melasma in comparison to the adjacent healthy skin.

MATERIALS AND METHODS

We performed a cross-sectional study. Forty two adult female patients with facial melasma, without any phototype restrictions, treated at the Dermatology Service in the Botucatu Medical School – UNESP (from January 2010 up to December 2011), were included in the experiment, after sign the Consent Form.

Melasma was clinically diagnosed by a senior dermatologist as adjacent healthy skin was identified.

The study was approved by the Ethical Commission on Institutional Research (453/2009).

Patients diagnosed with collagenosis, blood dyscrasia, using anticoagulant medication, immuno-suppressed, diabetics, with severe hypertension and pregnant women were excluded from the experiment.

Patients were told to stop any bleaching treatment to melasma, except sun block, 15 days before biopsy.

Obtaining skin fragments

Two biopsies (punch 2 mm) were performed in facial skin affected by melasma and also two in the adjacent healthy skin, with a 2 cm distance among samples. A fragment of healthy skin and another one of lesional skin were later placed in RNA and stored in a fridge for 24 hours under -80°C until the very moment when the gene expression study was done, using a real time technique. The other fragments were stored for 48-72 hours in bottles containing buffered formalin 10% to immunohistochemistry analysis.

Gene expression for β estrogen and progesterone receptors in healthy and lesional skin

RNA extraction

Two skin fragments (1 healthy and 1 lesional), stored in tubes type *ependorf* containing RNA *later*[™], were submitted to total RNA extraction, using the Illustra Kit (GE Healthcare), according to the producer's instructions. Initially, samples were digested with 350 μ L of RA1 tampon, increased with mercaptoethanol. Right after, the digested tissue was transferred to a filter with a collector tube and was spun for 1 minute at 11.000 g. After spinning, the filter was disposed and the filtered matter was transferred to a new 1.5 μ L *ependorf* tube. 350 μ L of 70% ethanol were added and homogenized for 30 seconds at 8.000 g. After such procedure, 350 μ L of MBD tampon were added and spun for 1 minute at 11.000 g in order to dry up the sample. The filtered matter was disposed and the collector tube put back into the column. The next step regarded submitting the samples to a treatment with RNase free DNase enzyme, aiming to eliminate possible contamination with residual genomic DNA. 200 μ L of RA2 tampon were added and spun for 1 minute at 8.000 g, and the columns were transferred to new collector tubes. Following up the samples wash process, 600 μ L of RA3 tampon were added, spun for 1 minute at 11.000 g and, after disposing the content of the collector tube, 250 μ L of RA3 tampon were added, spun for 2 minutes at 11.000 g. Columns were transferred to new tubes and the RNA was diluted in 30 μ of RNase-free water, facing further spun for 1 minute at 11.000 g. The extracted RNA was qualified by NaNo-Drop ND -1000 measurements. Técnica de procedimento não é necessária

The efficiency of the treatment with RNase-free DNase was verified by amplifying the constitutive gene from the β globine by PCR straight from the obtained

RNA, and visualizing in 1.5% agarose gel. Samples that did not present such amplification were considered in the study.

Obtaining cDNA

Right after the RNA extraction, samples with concentration between 0.02 and 0.2 µg/µL of RNA were submitted to cDNA obtainment by means of the *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), following producer's instructions. The mix held 10 µL of 10X RT buffer, 10 µL of 10X RT *Random primer*, 4 µL of dNTP mix (100 mM), 5 µL of MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* (50 U/ µL), 1 µL of milli-Q water and the same RNA volume. Cycling conditions to obtain cDNA were 10 minutes at 25°C, followed by 120 minutes at 37°C. The produced cDNA was used to detect and qualify gene expressions for β estrogen and progesterone receptors by a real time PCR technique.

Real Time PCR

Starting from the obtained cDNA it was performed a gene amplification for β estrogen receptors (ESR2; Hs01100353_m1) and progesterone (PGR; Hs00198499_m1), according to the protocols from the Applied Biosystems TaqMan™ Gene Expression Assays, in a Line Gene K (Bioer™) thermocycler, in a final volume of 20µL with a 5µL addition of cDNA from the 1:5 dilution samples. Reaction conditions were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, when fluorescence signs were acquired during annealing steps and amplification cycle extension (60°C for 1 minute). Samples were processed in duplicates in all essays. At the same time, it was performed a human β actine gene amplification (ACTB; Hs99999903_m1) as endogenous control, once the

real value for gene expression was given through a comparison between gene amplification of receptors' (β estrogen and progesterone) results and this constitutive gene.

Immunohistochemistry for β estrogen and progesterone nuclear receptors

Skin histological samples included in paraffin, 4 μ m thick, were placed over histological slides previously treated with Vectabond (*Vector Laboratories*) and dried out in an oven at 37°C for 24 hrs. Right after that, they were deparaffinized in xilol, in two 20 minutes immersions each, hydrated in absolute ethanol decreasing concentrations (95, 80 and 70%) and washed in fresh water for 10 minutes.

Further on, it was performed an endogenous peroxidase blocking with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes and, right after, an antigenic rescue in a microwave oven, at maximum temperature, in 10mM citrate tampon, 6.0 pH for 15 minutes and left to cool at room temperature for 40 minutes. So, slides were washed in fresh water for 10 minutes and the incubation with β estrogen nuclear anti-receptors (RB-10658, Lab Vision) and progesterone (PGR636, Lab Vision) anti-bodies, under 1:150 and 1:300 dilution.

Fragments of breast tissue and sebaceous hyperplasia were used as positive controls as proposed by Jang et al. [16] The positive marking was detected by a brownish color with nuclear cytoplasmic pattern. Negative controls were obtained omitting anti-receptors' anti-bodies.

A Giemsa counter-coloring was performed in order to improve the difference between receptors' histochemical marks and melanin.

Semi-quantitative analysis for β estrogen and progesterone nuclear receptors

The histological cuts submitted to healthy and lesional skin fragments' immuno-histochemical marks – from the same patient – were photographed in a light microscope (NCoolscope II, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan, 2009), under standardized white light and balance, in 40X increase and stored as files BMP, 24-bit (RGB) with 1280x960 pixels. Two pictures were captured by slides in areas with bigger epidermis immuno-histochemical (hotspot) marks.

Manual counting over nuclei marked on the photographed epithelia was done in a blind way. Nuclei were categorized individually according to marks such as strong, medium, weak and mark-free, in order to get the HSCORE.

The HSCORE is a method for assessing the extent of nuclear immune-reactivity, applicable to steroid receptors. The score is obtained by the following formula: $3 \times \text{percentage of strongly staining nuclei} + 2 \times \text{percentage of moderately staining nuclei} + \text{percentage of weakly staining nuclei}$, giving a range of 0 to 300. [17]

The dermal mark was also evaluated in duplicate, according to the Jang et al. [16] Dermis images were segmented after color deconvolution (H-DAB) and pixels percentage referred to nuclear marks from each dermis areas were calculated. [18-20]

Statistical analysis

Clinical and demographic groups included in the current study, as well as the outcomes from the semi-quantitative analysis and from β estrogen and progesterone receptor's expressions were submitted to statistical analysis by means of SPSS 20.0 software. [21]

Parametric distributions were represented by averages and standard deviations, non-parametric distributions were represented by medians and quartiles

(p_{25} and p_{75}) and compared by a t test from paired samples or Wilcoxon, when needed. Normality was estimated by the Shapiro-Wilk test. [22,23]

β estrogen and progesterone HSCORE was tested by means of a linear correlation through Spearman's test, and the outcomes rates were evaluated in a multivariate way, using a linear model generalized with mixed effects. [23]

Regarding all the performed tests, it was adopted the two-tailed 5% significance level.

RESULTS

Melasma first occurred in adulthood (menacme), and the average age ($\pm$ standard deviation) was 27.7 ± 3.1 years old.

The most prevailing phototypes (Fitzpatrick) were the intermediate ones (24.4% phototype III and 48.8% phototype IV). Family background, mainly related to first degree relatives, was referred in 70.4% of patients.

Pregnancy (34.2%), contraceptive pills (7.3%) and intense sun exposure (34.2%) were the most commonly identified triggering elements, regarding patient's reports.

Patients set in the current experiment showed no significant difference from the total sample of patients at outpatient clinic regarding gender, phototype, age group or age in which the disease first occurred (data not shown).

Table 1 substantiates HSCORE rates for β estrogen and progesterone epidermis nuclear expression in healthy skin and in melasma affected skin, percentage of dermal staining, besides RNAm gene expression rates from this receptors. There was a difference between immunohistochemical staining of epidermis samples, but not for dermis or gene expression.

One hundred and fourteen nuclei were sampled, in average, for each slide in order to set the HSCORE (Figure 1).

Table 1. Immunohistochemistry (epidermis: HSCORE and percentage of staining by dermal fields) for β estrogen and progesterone receptors and gene expression in healthy and melasma skin.

	Healthy skin	Melasma	P
HSCORE – β estrogen receptor [@]	97 (33-149)	157 (104-183)	<0,01*
HSCORE - progesterone [@] Receptor	19 (0-52)	58 (14-98)	<0,01*
Dermis (%) - estrogen β [#] Receptor	5,7 $\pm$ 3,4	6,9 $\pm$ 3,5	0,09**
Dermis (%) - progesterone [@] Receptor	2,4 (1,4-6,2)	2,8 (1,3-9,2)	0,75*
PCR - estrogen β [@] receptor	4,6 (1,2-20,8)	3,6 (1,0-11,2)	0,25*
PCR - progesterone [@] receptor	36,1 (10,8-196,4)	24,7 (9,8-62,0)	0,94*

[@] median and quartiles (p_{25} and p_{75}); [#] mean $\pm$ standard deviation; *Wilcoxon test; **student's t Test (for paired samples)

It was not observed a linear correlation between progesterone and β estrogen nuclear expression in healthy skin, with melasma. The Spearman coefficient $r_s = -0.06$ and 0.11 ($p > 0.50$) to epithelia (HSCORE); and $r_s = 0.23$ and 0.1 ($p > 0.26$), for dermal staining.

When adjusted by oral contraceptive, family background, age when it first appeared, melasma triggered by pregnancy or by sun exposure, HSCORE for β estrogen was different between healthy and lesional epidermis and presented higher rates (Figure 2) in patients whom melasma had occurred because of sunstroke ($p < 0.05$).

HSCORE for progesterone was different between healthy and melasma lesional epidermis, besides that, it presented higher rates in higher phototypes (Figure 3) and in patients without family melasma ($p < 0.05$) background (Figure 4)

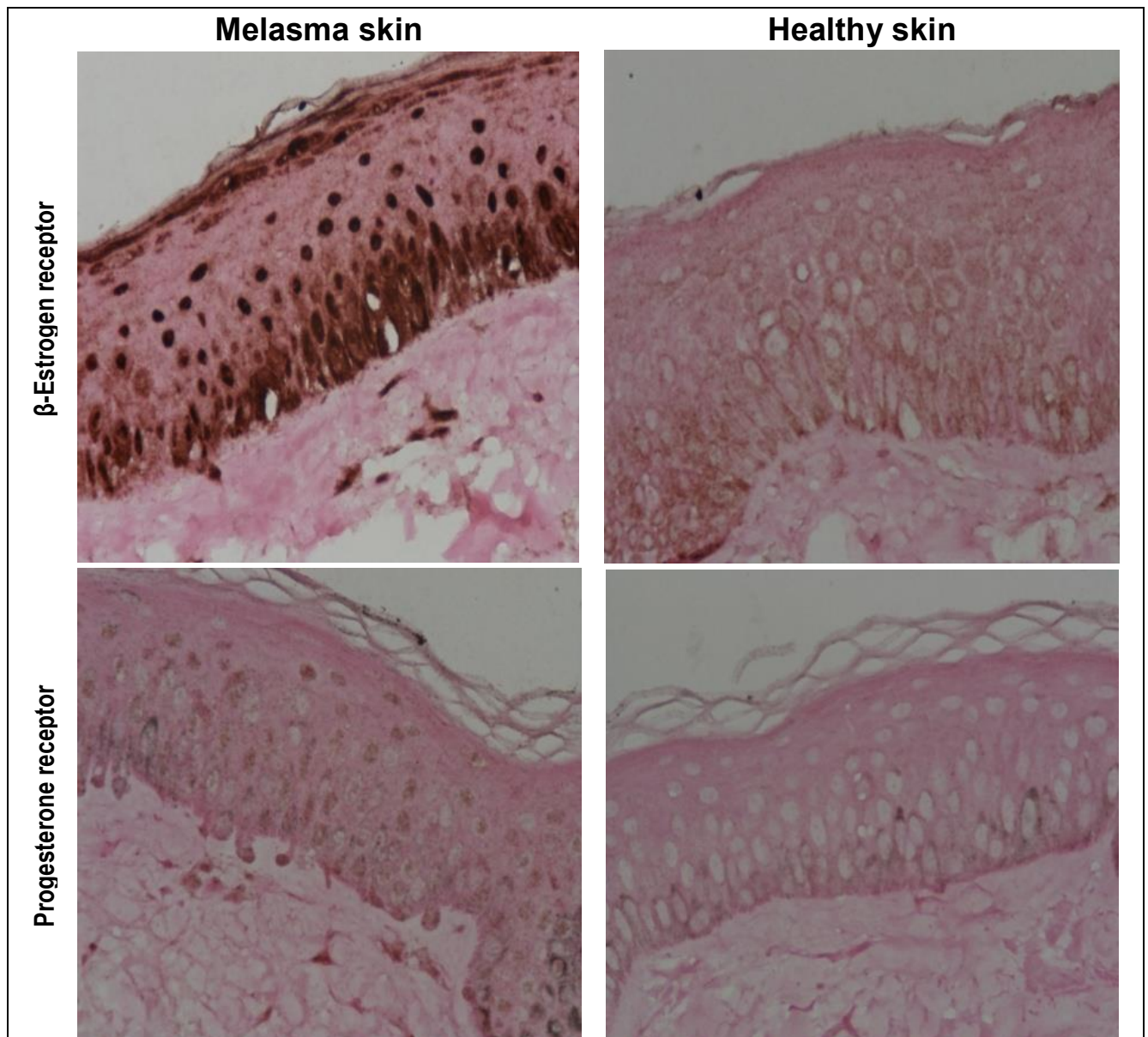


Figure 1. Healthy and lesional skin's estrogen and progesterone receptors. Nuclear staining for estrogen and progesterone receptors were stronger in melasma skin than perilesional.

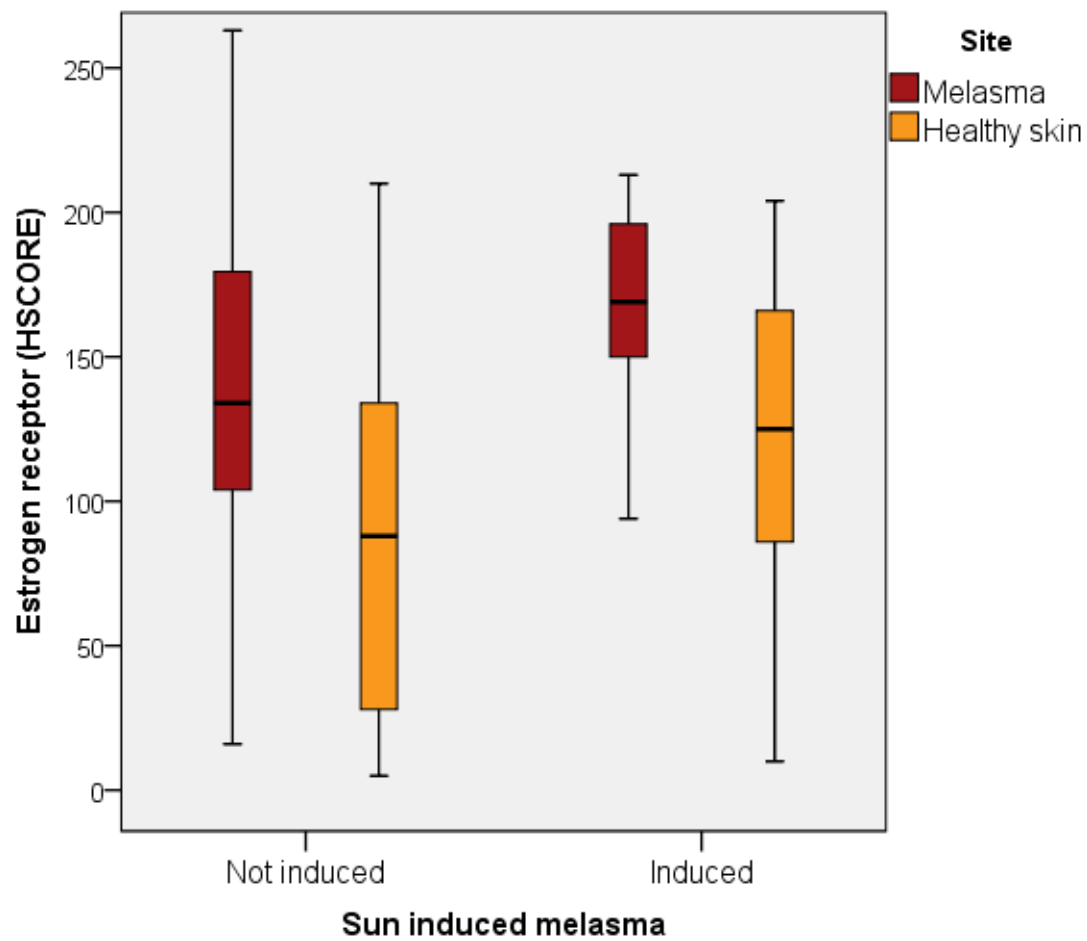


Figure 2. HSCORE of epithelial estrogen receptor according to sun exposure inducing melasma ($p < 0,05$).

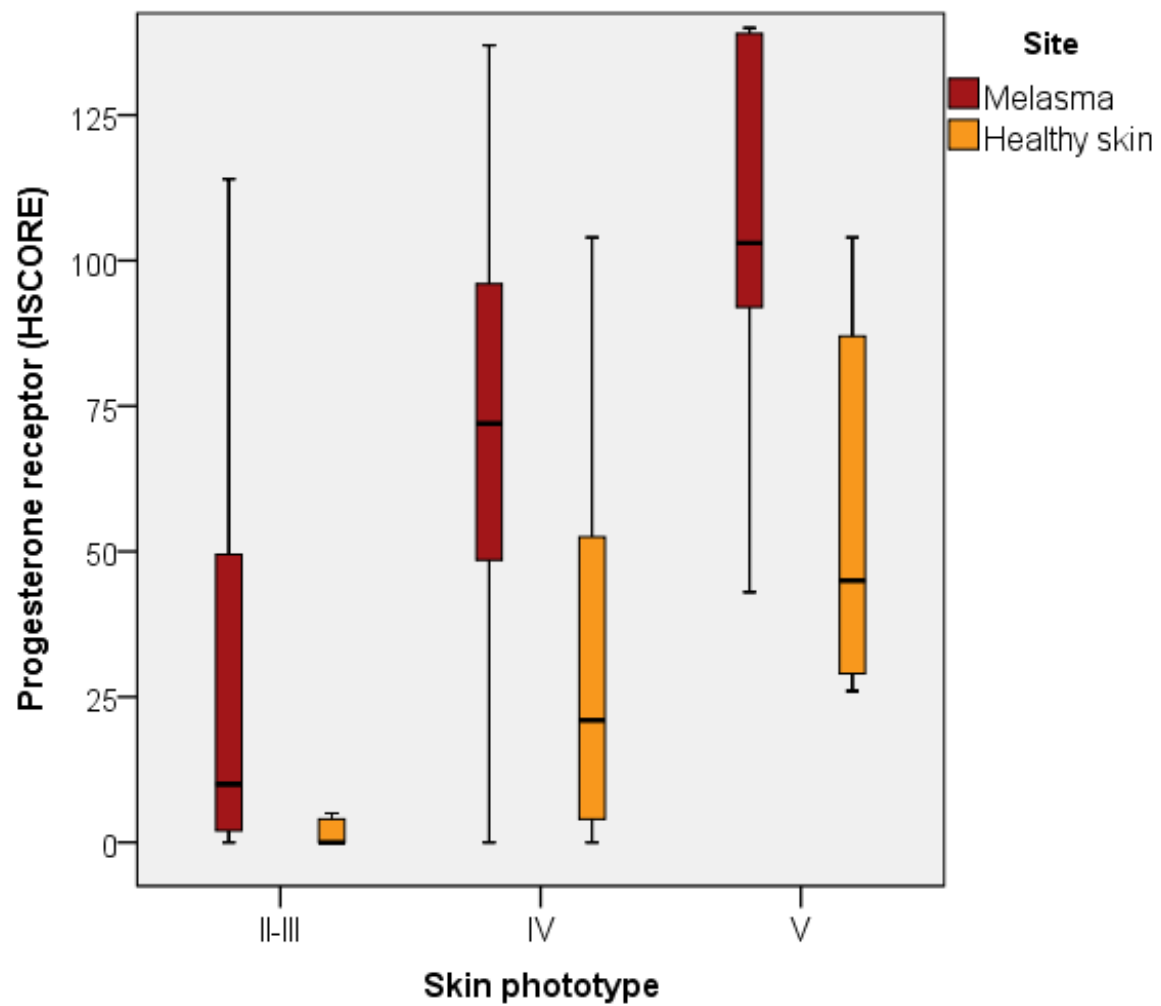


Figure 3. HSCORE of epithelial progesterone receptor according to (Fitzpatrick) phototype ($p < 0,05$).

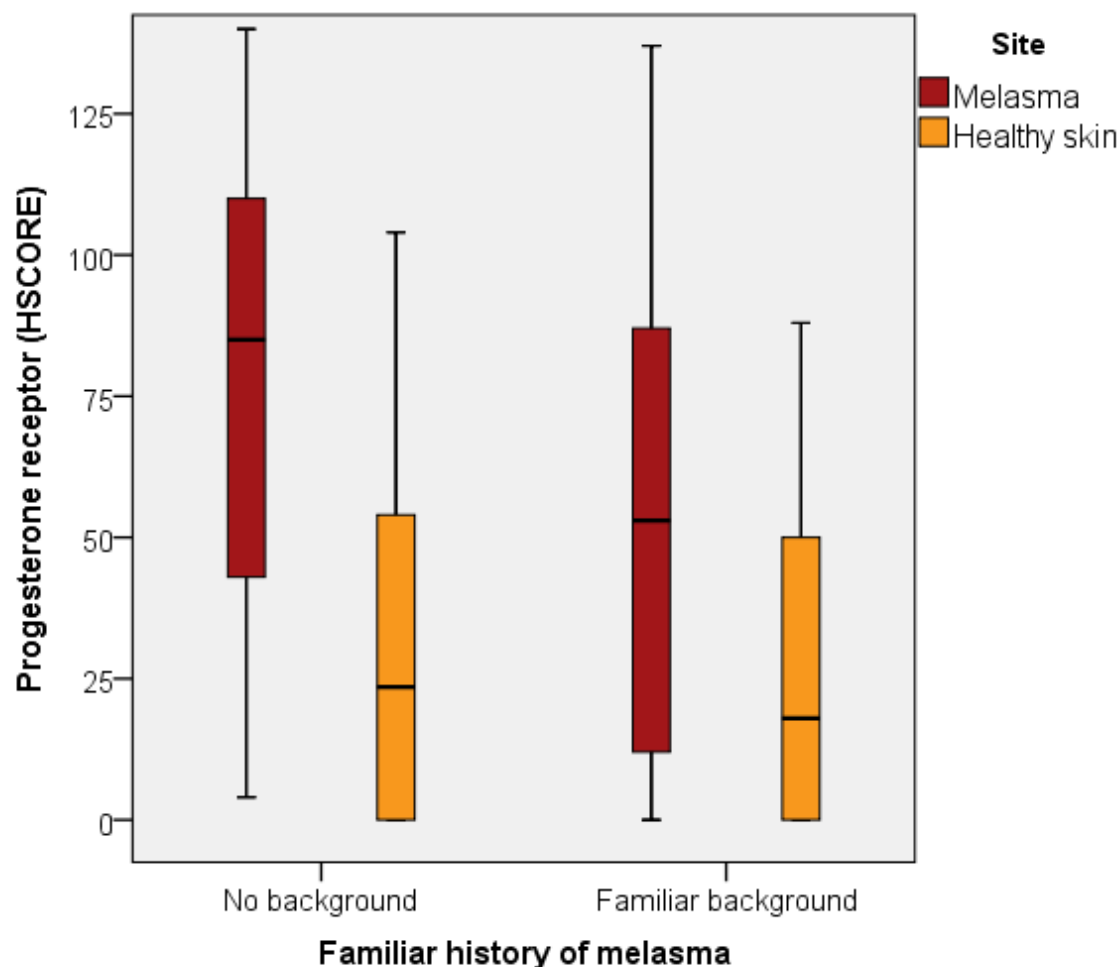


Figure 4. HSCORE of epithelial progesterone receptor according to family background ($p < 0,05$).

DISCUSSION

β estrogen and progesterone receptors were more expressive in keratinocyte nuclei in melasma affected skin than it was in the healthy skin around it, suggesting that they play a role in melasma's pathogenesis.

The estrogen's effects over melanocytes have been reported by many different authors. 17- β -estradiol causes tyrosinase dose-dependent increase, followed by a melanocyte's proliferation decrease. [24] Besides, melanocytes have estrogen receptors both in cytoplasm and in the nuclei; [25] and 17- β -estradiol

promotes a significant increase of MC1R mRNA's levels that is involved in melanin syntheses regulation. [26]

Such elements lead to the hypotheses that keratinocytes sensitive to sex steroid hormones related to stronger activities in melasma's epidermis-melanin unit. Other studies have identified differential changes in melasma affected epithelia, as the higher α -MSH and MC1-R expression, subsidizing the observation. [4, 27, 28]

Additionally, estrogen has been seen as related to skin's aging, pigmentation, hair growth, sebaceous production and to skin cancer. Estrogen's effects in skin prevent aging, through skin thickness influence over rhythids and hydration. Relative hypoestrogenism – which follows menopause – worsens intrinsic and extrinsic aging bad effects. [29]

Throughout pregnancy – especially in the third trimester – estrogen, progesterone and MSH high levels have been related to melasma. Sex steroid hormones increase the transcription of genes involved in human's melanocyte enzymes coding, mainly for Tyrosinase and Dopachrome tautomerase. [9]

According to the current study, pregnancy and oral contraceptive use were factors that caused the disease in more than 40% of cases, although, such factors do not explain the totality of events, leading to the idea that different elements are actually involved in the disease's genesis. [30,31]

Regarding melasma affected patients' photo exposed skin areas, it is possible to observe different phenotypic expressions in the epidermis-melanin unit overlaid in an intriguing way, suggesting the possibility of focal changes, mosaic like. Factors involved in its development must, in general, act straight over melanogenesis and over melanossomes cytotric activity, instead of a systemic change where it would be expected a generalized pigmentation, just as the one induced by ACTH

administration for patients. [32,33]

Estrogen regulates PDZK1 expression, at the same time inducing tyrosinase expression, although PDZK1 super-expression does not change melanocyte and/or keratinocyte rates. [34, 35] It was also shown the important role played by PDZK1 stimulation due to hyperpigmentation in melasma affected skin's patients, particularly when associated to estrogen, through identified clinic correlations and the action mechanism with its molecular interaction. [36]

H19 low expression is significantly correlated to melasma, and, in melanocyte cultures with H19 gene low expression, there was a Tyrosinase superexpression. [37] It suggests that H19 gene expression can lead to melasma developing susceptibility and estrogen level during pregnancy or the use of contraceptives can be expression regulator factors.

Sun exposure induced melasma presents higher β estrogen receptors HSCOREs for healthy and lesional skin, pointing towards the occurrence of receptor's upregulation by sun exposure, the main element associated to melasma development.

Lack of linear correlation between estrogen and progesterone receptor's nuclear expression suggests that the increase in receptor expression occurs independently in the samples. Besides, progesterone expression increased according to patient's phototypes, suggesting that it can play some role in melanogenesis.

In opposition to estrogen receptor, there is no literature explaining progesterone's role in dermal pigmentation. Progesterone is remarkably high during pregnancy, what can explain melasma occurrence at such phase, caused by epidermis' receptors activation. But, some progestogens groups, such as

clomadinoma, can counterbalance estrogen effects over pigmentation, protecting against melasma's development. [15, 29]

β estrogen and progesterone receptors' nuclear histological expression was not influenced by age, phototype, family background, age in which it first appeared, clinical pattern, disease induced by pregnancy or oral contraceptive. Such outcomes are different from YH Jang et al.'s study, which substantiated higher β estrogen receptor expression in the sub-group of patients with melasma related to pregnancy. [16] The more expressive sample size and the most sensible counting methodology we used in this study should have influenced the current outcomes.

Skin biopsies, regarding the different analysis in the current study, were done just in facial melasma, once healthy skin control was taken from skin around the lesions. It is important to highlight that facial skin presents higher melanocyte rates in comparison to the rest of the body, so, a comparison with skin from other areas would not be appropriate. Moreover, the comparison needs a control skin (healthy) submitted to the same environmental stimulus, such as sun exposure. [4]

Evidences show that melanocytes from melasma affected skin are locally hyperfunctioning due to specific paracrine stimulus from melanogenic substances secreted by neighbor keratinocyte, influenced by environmental factors, among them, ultra-violet radiation and sex steroid hormones. [14, 24, 25]

Identifying increased level of estrogen and progesterone receptors in melasma affected skin brings up arguments in order to investigate local hormonal blocking in melasma's outcome

Although β estrogen and progesterone receptors protein expression increase in lesional epithelia by melasma is a possible mechanism involved in local occurrence of the disease, β estrogen and progesterone receptor's RNAm relative

concentration was not different in healthy and lesional skin fragments.

Such outcomes can be explained, partially, by the fact that RNA identification did not happen only between keratinocyte, but in all cells sampled in the fragment, including dermis, which presented similar immunohistochemical marks among samples. Yet, it is important to consider that the RNA's presence, does not necessarily mean, protein production. Moreover, it is known that the difference in specific RNA rates, among biological samples, is not necessarily reflected by an equivalent difference in protein rates. [38] Thus, a similar relative RNAm concentration found in healthy and lesional skin fragments can also be the reflex of post-transcriptional control in healthy skin, and studies that investigate epigenetic regulator elements such as microRNAs must explore such question.

Other studies must be done in order to elucidate elements involved in melasma's physiopathology, once just the β estrogen and progesterone receptors quantitative difference would not be the only explanation for its physiopathology, by the occurrence of the disease in men and menopause women and by 17- β -estradiol non-genomic effects in epidermis.

Melasma which affects upper members of the body is more common among menopause women, when submitted to hormone replacement therapy. [7] Besides, estradiol increases β estrogen receptor expression in dermis fibroblast cultures in menopause women. [39]

Whereas melasma's physiopathology is still little clarified, the disease will keep being a source for research and a therapeutic challenge.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Carlos Pedroso de Lima for preparing the slides to be used in

histopathological analysis and Marcos Roberto Franchi for preparing the slides to immuno-histochemical analysis.

REFERENCES

- [1] Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. [Physiopathology of melasma]. *An Bras Dermatol*. 2009;84; 623-635.
- [2] Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML, Azulay L, Hassun K, Almeida AR, et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol*. 2006;156 Suppl 1; 13-20.
- [3] Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int J Dermatol*. 1998;37; 897-903.
- [4] Kang WH, Yoon KH, Lee ES, Kim J, Lee KB, Yim H, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol*. 2002;146; 228-237.
- [5] Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2013;27:151-6.
- [6] Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP, Hori Y. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF *Dermatology in General Medicine*. New York. Mcgraw-Hill, 1999. 936-944.
- [7] Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol*. 1998;139; 932.
- [8] Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol*. 1995;131; 1453-1457.
- [9] Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J*. 2007;21; 976-994.
- [10] Sacre RC, Fernandes NC, Vaisman M, Tendrich M. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. *An Bras Dermatol*. 1996;71; 195-198.
- [11] Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol*. 2005;27; 96-101.
- [12] Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol*. 1998;139; 444-452.
- [13] Im S, Lee ES, Kim W, On W, Kim J, Lee M, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes. *J Korean Med Sci*. 2002;17; 58-64.
- [14] Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol*. 2002;146; 165-167.
- [15] Wiedemann C, Nagele U, Schramm G, Berking C. Inhibitory effects of progestogens on the estrogen stimulation of melanocytes in vitro. *Contraception*. 2009;80; 292-298.
- [16] Jang YH, Lee JY, Kang HY, Lee ES, Kim YC. Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24; 1312-1316.
- [17] Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88; 2309-2317.
- [18] Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001;23; 291-299.
- [19] Miot HA, Brianezi G, Tamega Ade A, Miot LD. Techniques of digital image analysis for histological quantification of melanin. *An Bras Dermatol*. 2012;87; 608-611.
- [20] Brianezi G, Minicucci EM, Marques ME, Miot HA. Evaluation epidermal p53 immunostaining by digital image analysis. *Skin Res Technol*. 2012.
- [21] IBM SPSS 20.0 for Windows. 20 ed. Chicago (IL). SPSS Incorporation, 2011. Statistical Package for Social Science (SPSS).
- [22] Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta*. 2006;366; 112-129.
- [23] Norman GR, Streiner DL. Biostatistics. The bare essentials. 3rd ed. Shelton, Connecticut. People's Medical Publishing House. 2008.

- [24] Ranson M, Posen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones: in vitro studies with 1 alpha-25, dihydroxyvitamin D3, alpha-melanocyte stimulating hormone, and beta-estradiol. *J Invest Dermatol.* 1988;91; 593-598.
- [25] Jee SH, Lee SY, Chiu HC, Chang CC, Chen TJ. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199; 1407-1412.
- [26] Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* 2002;15; 433-439.
- [27] Miot LD, Miot HA, Polettini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol.* 2010.
- [28] Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol.* 2007;82; 529-564.
- [29] Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res.* 2007;39; 85-95.
- [30] Resnik S. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 1967;199; 601-605.
- [31] Nicolaidou E, Antoniou C, Katsambas AD. Origin, clinical presentation, and diagnosis of facial hypermelanoses. *Dermatol Clin.* 2007;25; 321-326, viii.
- [32] Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004;84; 1155-1228.
- [33] Klaus SN, Snell RS. The response of mammalian epidermal melanocytes in culture to hormones. *J Invest Dermatol.* 1967;48; 352-358.
- [34] Ediger TR, Kraus WL, Weinman EJ, Katzenellenbogen BS. Estrogen receptor regulation of the Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *Endocrinology.* 1999;140; 2976-2982.
- [35] Stemmer-Rachamimov AO, Wiederhold T, Nielsen GP, James M, Pinney-Michalowski D, Roy JE, et al. NHE-RF, a merlin-interacting protein, is primarily expressed in luminal epithelia, proliferative endometrium, and estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Am J Pathol.* 2001;158; 57-62.
- [36] Kim NH, Cheong KA, Lee TR, Lee AY. PDZK1 Upregulation in Estrogen-Related Hyperpigmentation in Melasma. *J Invest Dermatol.* 2012;132; 2622-2631.
- [37] Kim NH, Lee CH, Lee AY. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23; 84-92.
- [38] Binneck E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento.* 2004;32; 28-37.
- [39] Haczynski J, Tarkowski R, Jarzabek K, Wolczynski S, Magoffin DA, Czarnocki KJ, et al. Differential effects of estradiol, raloxifene and tamoxifen on estrogen receptor expression in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2004;13; 903-908.

4. Conclusões

Houve maior expressão nuclear de receptores de estrogênio β e progesterona na pele com melasma facial que na pele sã adjacente, sugerindo a participação hormonal na patogênese da doença, entretanto isto não foi ratificado pela expressão gênica na pele total.

5. Perspectivas

O melasma inflige importante impacto na imagem pessoal, causando estresse emocional, alterando a qualidade de vida dos pacientes acometidos, além dos custos relacionados aos tratamentos e procedimentos, cujos resultados, nem sempre, correspondem às expectativas dos pacientes.

Melasma tem etiologia multifatorial, envolvendo elementos genéticos, comportamentais e de exposição, interferindo com a função de toda a unidade epidermomelânica.

O favorecimento da eumelanogênese envolve mediadores inflamatórios, fatores de crescimento, síntese parácrina de MSH e expressão de receptores de hormônios sexuais; porém, a alteração primária subjacente que leva a todos esses elementos ainda não é conhecida, e receptores de hormônios devem ter participação importante mas não exclusiva na sua patogênese.

De maneira geral, o prognóstico do melasma é favorável, observando-se uma redução da sua prevalência e da intensidade das lesões com a idade e atenuação da pigmentação com o tratamento. O fato do melasma diminuir de incidência com a idade pode ser devido à redução dos hormônios sexuais e/ou redução do número de melanócitos.

É intrigante que nas lesões do melasma ocorram comportamentos de resposta melanogênica mais intensa que áreas saudáveis contíguas, submetidas a regimes semelhantes de fotoexposição, sugerindo um comportamento de mosaicismo genético pós-somático do sistema pigmentar, cujo substrato genômico, também não é ainda totalmente compreendido.

Estudos com interferência genética, como microRNA podem elucidar o

comportamento de genes candidatos quanto às alterações que podem induzir a pigmentação de maneira tão peculiar.

A compreensão disso pode levar hipóteses de formas de reversão desse fenótipo localizado e idealizar novas estratégias terapêuticas para reduzir a aflição que a doença inflige em seus pacientes.

6. Anexos

Anexo I – Artigo de epidemiologia do melasma

ORIGINAL ARTICLE

Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women

A.de.A. Tamega,[†] L.D.B. Miot,[†] C. Bonfietti,[†] T.C. Gige,[†] M.E.A. Marques,[†] H.A. Miot^{†,*}

[†] Department of Dermatology, Sao Paulo State University, Botucatu Medical School, Unesp, Campus Universitário de Rubião,

Botucatu, SP, Brazil ‡ Department of Pathology, Sao Paulo State University, Botucatu Medical School, Unesp, Campus Universitário de Rubião, Botucatu, SP, Brazil

*Correspondence: H.A. Miot. E-mail: heliomiot@fmb.unesp.br

DOI: 10.1111/j.1468-3083.2011.04430.x

JEADV 2013, 27, 151–156

Abstract

Background Melasma is a common acquired chronic hypermelanosis of sun-exposed areas which significantly impacts quality of life. There are few epidemiological studies in medical literature concerning these patients.

Objective Characterize clinical and epidemiological data on Brazilian female patients with melasma.

Methods A semi-structured questionnaire was administered to melasma patients treated at a dermatology clinic between 2005 and 2010. Association between variables was performed by multivariate regression models.

Results We assessed 302 patients; intermediate skin phototypes III (34.4%) and IV (38.4%) were prevalent. Mean disease onset age was 27.5 ± 7.8 years and familiar occurrence of melasma was identified in 56.3%. The most commonly reported trigger factors were pregnancy (36.4%), contraceptive pills (16.2%) and intense sun exposure (27.2%). Preferred facial topographies were zygomatic (83.8%), labial superior (51.3%) and frontal (49.7%). Pregnancy induced melasma has been associated to early disease (OR = 0.86) and number of pregnancies (OR = 1.39). Childbearing was correlated to melasma extension. Older disease onset age was associated to darker skin phototypes. Co-occurrence of facial topographies supported clinical classification as centrofacial and peripheral melasma.

Conclusion This population was characterized by: a high prevalence in adult females, intermediate skin phototypes, disease precipitation by hormonal stimulus and familiar genetic influence.

Received: 29 August 2011; Accepted: 9 December 2011

Introduction

Melasma is a common chronic acquired hypermelanosis that causes important aesthetic involvement and decreases quality of life. It mainly affects adult women of childbearing age from all ethnic groups and is characterized by brown symmetrical, homogeneous, irregular macules in sun-exposed areas, mostly on the face.¹⁻⁵

The epidermis of melasma reveals local melanocytic hyperactivity without melanocyte hyperplasia. The number of melanosomes and their degree of maturity are increased causing hyperpigmentation in all epidermal layers. Dermal elastosis and slight lymphocytic infiltrate are also observed. However, most of the physiopathology is still not fully understood.⁶⁻¹⁰

Several factors have been implicated in melasma development, but none are individually responsible. Pregnancy, hormonal therapies, oral contraceptive pills, cosmetics, photosensitizing medications, endocrinopathies, emotional stress and anticonvulsants have been reported, along with a genetic predisposition and exposure to sunlight, as the main factors for melasma development.¹¹⁻¹⁴

The American Academy of Dermatology estimates that melasma affects 5–6 million women in the United States.¹⁵ Pigmentation disorders were the third largest group of diseases (8.8%) detected in dermatological consultations in the last Brazilian dermatological census, and the second largest dermatology office complaint in women (11.6%).¹⁶

Population-based studies in pregnant women have revealed a varying melasma prevalence of 10–70%, suggesting that other factors, such as ethnicity and sun exposure, are involved in its development.¹⁷⁻²⁰

Family history of melasma occurs in about 50% of patients, particularly in those with darker skin types.¹⁵

There are several clinical classifications regarding the topographical locations of these lesions. Centrofacial, malar and mandibular are the most common, although some authors prefer more objective classifications such as: central, peripheral, mixed (facial) and extrafacial.^{3,21}

There are few epidemiological studies on the clinical issues of melasma or analytical studies that explore the relationship between its demographic and clinical variables. This work evaluates the main clinical patterns and epidemiological aspects of facial melasma in Brazilian women.

Materials and methods

An observational and analytical epidemiological study was performed by interviewing adult women with melasma attending the dermatology clinic from 2005 until 2010 at Botucatu School of Medicine-UNESP, São Paulo, Brazil. There were no restrictions regarding ethnicity, Fitzpatrick's skin phototype classification (I–VI),²² diagnosis status (old and newly diagnosed),

or treatment.

All volunteers answered a semi-structured questionnaire on clinical and demographic information specially developed for this study. Interviews were performed by dermatologists and supervised by the principal authors (A.A.T. and L.D.B.M.) during routine dermatologic consultation.

Basal cortisol and thyroid-stimulating hormone (TSH) were collected from patients in the morning and analyzed at the institutional laboratory by chemiluminescence and radioimmunoassay. TSH values outside 0.4–4.0 Ig/dL and basal cortisol values outside 3.7–19.4 IU/mL were considered abnormal.

This study was approved by Botucatu School of Medicine Research Ethics Committee (293 / 2004), and all participants signed an informed consent form for clinical and laboratorial investigation.

Categorical variables were represented by their percentages and 95% confidence intervals were estimated (CI 95%). Quantitative data were represented by mean and standard deviation, or median and interquartile range if non-parametric. Normality was assessed by Shapiro-Wilk test.²³

Subgroups were explored by multivariate analysis. Dependent variables were adjusted by other covariates using an unconditional multiple logistic regression model. Association between categorical variables was estimated by odds ratio (OR) and its respective CI 95%. Multivariate analysis of continuous dependent variables was performed by a generalized linear model. All multivariate models were built according to the selection of covariates which reached significance ($P < 0.3$) in a bivariate analysis.²⁴ All tests considered a two tailed P value of 0.05 as significant. Topographical lesion patterns were evaluated by hierarchical cluster analysis (Ward's method).²⁵

Data were tabulated in MS Excel 2007 and analyzed by SPSS 17.0 software.^{26,27}

Results

Three hundred and two patients were included in the study; their main clinical and demographical information are presented in Tables 1 and 2.

Melasma onset occurred in adulthood (menacme) (Fig. 1), age (mean $\pm$ standard deviation) was 27.5 ± 7.8 years. Disease duration (median $\pm$ interquartile range) was 9 ± 11 years.

There were no Asians and no currently pregnant women in the sample.

Intermediate skin phototypes (Fitzpatrick) were prevalent (Table 1), a positive family history of melasma was also expressive, mainly (70.4%) in first-degree relatives, as was living by the sea or on a farm.

Pregnancy, birth control pills and intense sun exposure were the most common causative elements identified by patients (Table 1).

Hierarchical cluster co-occurrence analysis of facial topographies revealed two main patterns of lesion distribution in patients (Fig. 2).

Group 1 revealed a centropacial pattern and Group 2 a peripheral topography. Table 2 presents both topography frequencies, and their clinical and cluster-related classifications.

Combined facial patterns were the most common presentation, followed by the centrally exclusive ones. The zygomatic, labial superior, frontal, nasal and parotid regions were the most affected. Extrafacial occurrence was observed in 7.9% of those with facial melasma. Six or more facial regions were involved in most patients. Zygomatic occurrence was frequently associated to other lesions (90.5%), mainly centropacial topographies.

Abnormal TSH hormonal profiles were found in 25.3% (24.1% high and 1.2% low) and cortisol in 9.6% (7.7% high and 1.9% low) of patients. These findings were consistent with prevalence levels in the adult female population ($P > 0.3$).²⁸ High TSH levels were associated to intense sun exposure induced melasma (OR = 2.15; CI 95% 1.00–4.69). High cortisol levels were associated to a lower number of pregnancies (OR = 0.02; CI 95% 0.01–0.23) and

	Hormone replacement therapy	3	1.0	0.0–2.1
Affected facial site	Zygomatic (malar)	253	83.8	79.6–87.9
	Labial superior	155	51.3	45.7–57.0
	Frontal	150	49.7	44.0–55.3
	Nasal	122	40.4	34.8–46.0
	Parotid	90	29.8	24.6–35.0
	Mentonian	88	29.1	24.0–34.3
	Glabellar	76	25.2	20.3–30.1
	Temporal	73	24.2	19.3–29.0
	Mandible	54	17.9	13.5–22.2
	Upper chest	18	3.3	3.3–8.6
Clinical classification†	Upper limbs	7	0.6	0.6–4.0
	Neck	7	0.6	0.6–4.0
	Central	156	51.7	46.0–57.3
Cluster classification	Peripheral	15	5.0	2.5–7.4
	Combined	131	43.4	37.8–49.0
Clinical classification‡	Centropacial (Cluster 1)	209	69.2	64.0–74.4
	Peripheral (Cluster 2)	93	30.8	25.6–36.0

†Among who have got pregnant.

‡Facial types.

CI, confidence interval.

Table 1 Main demographic patient data

	N	Percentage (%)	CI 95%
Skin phototype	I	2	0.7
	II	28	9.3
	III	104	34.4
	IV	116	38.4
	V	47	15.6
	VI	5	1.7
Family occurrence†	169	56.3	50.7–62.0
First-degree	119	47.6	41.4–53.8
Living at seacoast or farm	159	52.6	44.5–60.8
Sun exposed occupations	146	48.5	40.7–56.4
Ever smoking	73	31.2	25.2–37.2
Hormonal contraceptive‡	115	38.1	32.6–43.6
Regular sunscreen use‡	251	57.3	52.7–62.0

†First or second degree.

‡Current use.

CI, Confidence interval 95%.

disease induced by oral contraceptives (OR = 6.77; CI 95% 1.07–42.98), but not to any clinical variable.

A first-degree family report of melasma was associated to a higher chance of living on a farm or by the sea (OR = 1.76; CI 95% 1.07–2.88) and longer disease duration (OR = 1.03; CI 95% 1.00–1.07), but not to any clinical pattern or skin phototype.

Of those who reported pregnancy ($n = 244$), the median ($\pm$ interquartile range) was 2 ± 2 pregnancies. Melasma triggered during gestation was associated to early disease onset (OR = 0.86; CI 95% 0.82–0.90) and directly to the number of pregnancies (OR = 1.45; CI 95% 1.14–1.84), but not to any clinical pattern.

Oral contraceptive pill induced melasmas were inversely associated to the number of pregnancies (OR = 0.71; CI 95% 0.55–0.92) and mentonian lesions (OR = 0.41; CI 95% 0.18–0.93).

Table 2 Main clinical patient data

	N	Percentage (%)	CI 95%
Triggering factors Anyone reported	274	90.7	87.4–94.0
Pregnancy†	110	36.4	31.0–41.9
Intense sun exposure	82	27.2	22.1–32.2
Contraceptive pills	49	16.2	12.1–20.4
Psychological stress	20	6.6	3.8–9.5
Cosmetics	10	3.3	1.3–5.3

Late melasma onset positively correlated to multiple pregnancies and peripheral clinical classification ($P < 0.05$). Nevertheless, lighter skin phototypes, melasma induced by pregnancy or contraceptive pills, and frontal and upper lip lesions correlated to early disease onset ($P < 0.05$).

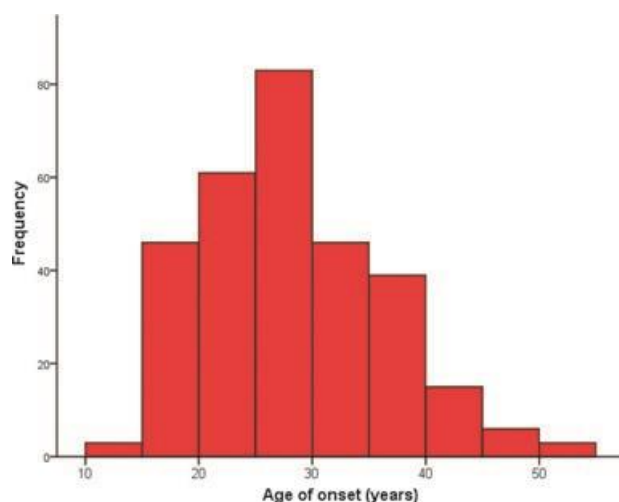


Figure 1 Histogram of facial melasma onset ages.

Total number of melasma affected areas directly correlated to early disease onset and disease induced by pregnancy ($P < 0.05$).

Cases with longer follow-up were associated to darker skin phototypes, mandibular and parotid (peripheral) involvement and induction by pregnancy ($P < 0.05$). Upper lip occurrence was associated to more recent cases ($P < 0.05$).

Discussion

In this sample, facial melasma was common in middle-aged woman with intermediate skin phototypes. A high familiar disease frequency was reported, and topographical exploration of cooccurrences revealed two main facial clinical patterns: centrofacial and peripheral.

Despite the high frequency of melasma in dermatological patients, there are few epidemiological studies with representative samples. Also, disease characteristics in different populations can vary according to genetic and environmental aspects.¹⁴ Far Eastern and Latin people, and pregnant women are the best studied groups, as melasma rarely affects patients with lower skin phototypes and frequently occurs or worsens during pregnancy.^{8,18,29,30}

Several series of cases, in different ethnic groups have emphasized female involvement (9:1) during childbearing age.^{4,8,31} Reports of rare melasma findings in Andean children strengthen the adult profile and add weight to photoexposure as a major risk factor.²⁹ In our study, the higher levels of disease onset between the second and fourth decades corroborate findings in literature and suggest a possible hormonal relationship in its pathophysiology.³²⁻³⁵

In studies on idiopathic melasma, Sacre et al. found normal thyroid hormonal levels, prolactinic and gonadotrophic stores in their patients. The abnormal TSH and cortisol levels in our study did not indicate they were major endocrinological factors, as the

observed alterations were similar to subclinical disease frequencies in the adult female population.^{28,36}

Intense sun exposure induced melasma has been associated to abnormal TSH levels. Lutfi et al. found a higher prevalence of thyroid autoimmunity in melasma patients, but they did not stratify prevalence by melasma cause.³² The role of anomalous TSH in sun exposure developed melasma should be investigated by further studies.

Exogenous sexual steroids have been implicated as melasma triggers, and for being specifically responsible for its later appearance, masculine cases and extrafacial topography.^{5,37-41}

Oral contraceptive pills and pregnancy are classically reported triggers of the disease. Moreover, we found that higher cortisol levels were also associated to hormonal induced melasmas, strengthening the endocrine origin hypothesis.⁴² Whilst persisting indefinitely in only one third of pregnant melasma patients,^{15,43} when induced by oral contraceptive pills it does not tend to disappear after pill suspension.^{29,44} Our study revealed that pregnancy induced melasma began earlier and was more common in those who have had multiple pregnancies, corroborating Ortonne et al.¹⁵

The effects of estrogen and progesterone in melanogenesis have been reported by many authors.^{37,45,46} Pregnancy and oral contraceptives pills were disease triggering factors in more than 50% of cases in our study.^{21,46,47}

First degree family history occurred in more than 45% of cases, supporting genetic factors as important in developing melasma.^{13,29,48} In our analysis, more than half the patients reported some family member with melasma, although these data must be carefully interpreted considering memory bias and also the association between family linkage and having lived on a farm or by the sea. Patients who reported positive family history also had longer disease duration, suggesting a genetic predisposition to a disease sustaining factor.

Melasma prevalence was higher in intermediate skin phototypes (Fitzpatrick scale III, IV and V). The low incidence of melasma in extreme skin phototypes suggests some stability or homogeneity in ultraviolet (UV) reaction regarding their pigmentation system.¹⁰

Areas affected by melasma have intense melanogenesis, more efficient citocinic activity (melanosome transference), and mature melanosome transportation with greater proportion of eumelanin, simulating a localized higher skin phototype. This argument is strengthened by increased melasma frequency in Latin and Asian phenotypes, as opposed to a lower frequency in Caucasian and African peoples.^{8,15,31,49} Our data also showed that the highest phototypes have the oldest disease onset ages, substantiating melanin UV protection in melasma development.

Unprotected UV radiation exposure is supposed to be the most important environmental triggering factor in clinical issues of melasma.^{4,44} This could also be seen in our sample due to the predominant centrofacial location of lesions and a study reporting more than 25% melasma onsets after intense sun exposure.⁵⁰

Another Brazilian study also found this Centrofacial predominance. The clinical classification of melasma

Conclusions

We characterized a sample of Brazilian women with facial melasma. The main findings were disease onset at childbearing age, high reported frequency of familiar disease, intermediate skin phototypes and precipitation by hormonal stimuli. The co-occurrence of facial topographies supported a clinical

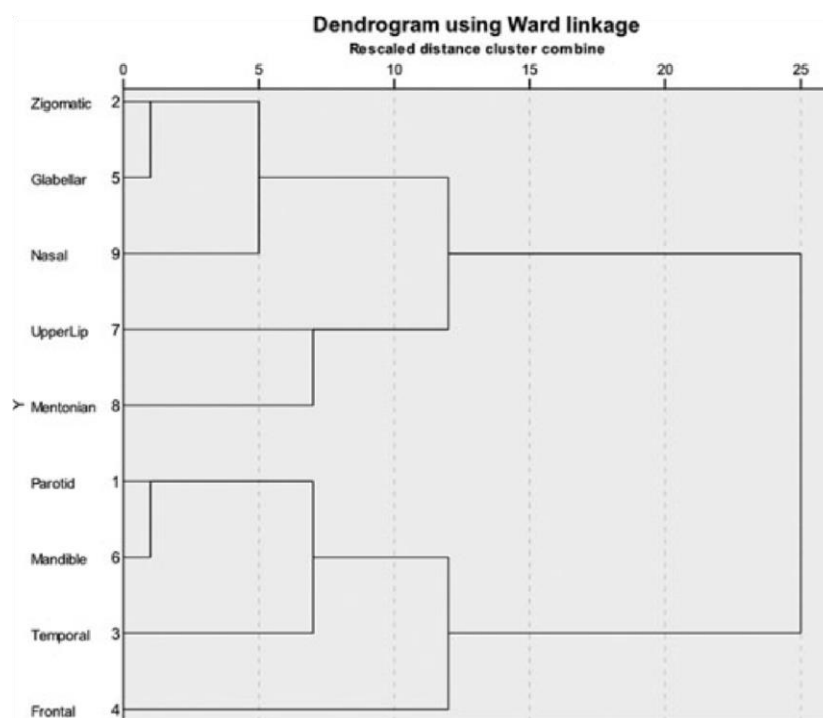


Figure 2 Dendrogram revealing two main co-occurrence patterns for melasma facial lesions.

is a theme that must be better assessed with proper methodological designs. Although evident by Woods lamp examination, the division between dermal and epidermal does not have histopathological support, besides being related to treatment resistance.^{6,8,51,52} Categorization into facial and extra-facial types is simple, but reductionistic, and does not give value to the many clinical presentations on the face, or other associations. Their designation as centrofacial, malar and mandibular does not take into account the peripheral and combined forms.^{3,4,34} Our study identified a predominance of central melasma, with a higher frequency in the centrofacial regions.

There was no evidence to support an exclusively mandibular classification, as suggested by some authors.⁵³ In fact, 64.8% of mandibular incidence co-occurred with parotid topography, and just two cases (3.7%) presented solely with mandibular lesions.

The main limitations of this study are related to the evaluation of patients under dermatological treatment and the possibility that treatment and length of time modify clinical patterns of the disease. Furthermore, the possibility of memory bias regarding familiar history and triggers should be considered. Finally, this study was a sample of women attending a public dermatology service and cannot therefore be representative of all Brazilian women.

classification of centrofacial and peripheral melasma.

Author contribution

Luciane, Hélio, Márcia and Mariângela contributed to project ideation; Andréia, Luciane, Hélio, Camila and Tatiana performed data collection/tabulation and text elaboration; Hélio, Camila and Tatiana analyzed the data; Andréia, Luciane, Hélio, Camila, Tatiana and Mariângela revised and approved the text.

References

- 1 Guevara IL, Pandya AG. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and a fluorinated steroid. *Int J Dermatol* 2001; 40: 212–215.
- 2 Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP, Hori Y. Normal skin color and general considerations of pigmentary disorders. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF eds. *Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, New York, 1999: 936–944.
- 3 Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm MC Jr. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 698–710.
- 4 Grimes PE. Melasma etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1453–1457.
- 5 Johnston GA, Sviland L, McLelland J. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1998; 139: 932.

- 6 Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol* 2007; 82: 529–564.
- 7 Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 96–101.
- 8 Kang WH, Yoon KH, Lee ES et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002; 146: 228–237.
- 9 Moncada B, Sahagun-Sanchez LK, Torres-Alvarez B, Castanedo-Cazares JP, Martinez-Ramirez JD, Gonzalez FJ. Molecular structure and concentration of melanin in the stratum corneum of patients with melasma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009; 25: 159–160.
- 10 Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol* 2009; 84: 623–635.
- 11 Duarte I, Campos Lage AC. Frequency of dermatoses associated with cosmetics. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 211–213.
- 12 Wolf R, Wolf D, Tamir A, Politi Y. Melasma: a mask of stress. *Br J Dermatol* 1991; 125: 192–193.
- 13 Hughes BR. Melasma occurring in twin sisters. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 841.
- 14 Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a comprehensive update. Part I. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65: 689–697.
- 15 Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 1254–1262.
- 16 Sociedade Brasileira de Dermatologia SBD. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol* 2006; 81: 89.
- 17 Costin GE, Birlea SA. What is the mechanism for melasma that so commonly accompanies human pregnancy?. *IUBMB Life* 2006; 58:55–57.
- 18 Moin A, Jabery Z, Fallah N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy. *Int J Dermatol* 2006; 45: 285–288.
- 19 Sodhi VK, Sausker WF. Dermatoses of pregnancy. *Am Fam Physician* 1988; 37: 131–138.
- 20 Hexsel D, Rodrigues TC, Dal'Forno T, Zechmeister-Prado D, Lima MM. Melasma and pregnancy in southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 367–368.
- 21 Nicolaidou E, Antoniou C, Katsambas AD. Origin, clinical presentation, and diagnosis of facial hypermelanoses. *Dermatol Clin* 2007; 25: 321–326.
- 22 Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988; 124: 869–871.
- 23 Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta* 2006; 366: 112–129.
- 24 Bagley SC, White H, Golomb BA. Logistic regression in the medical literature: standards for use and reporting, with particular attention to one medical domain. *J Clin Epidemiol* 2001; 54: 979–985.
- 25 Norman GR, Streiner DL. Biostatistics. The bare essentials. 3rd ed. People's Medical Publishing House, Shelton, Connecticut, 2008.
- 26 Mushquash C, O'Connor BP. SPSS and SAS programs for generalizability theory analyses. *Behav Res Methods* 2006; 38: 542–547.
- 27 Statistical Package for Social Science (SPSS). SPSS 17.0 for Windows. in. 17 ed. SPSS Incorporation, Chicago (IL), 2008.
- 28 Wilson GR, Curry RW Jr. Subclinical thyroid disease. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1517–1524.
- 29 Scheinfeld NS. Melasma. *Skinmed* 2007; 6: 35–37.
- 30 Sarkar R, Jain RK, Puri P. Melasma in Indian males. *Dermatol Surg* 2003; 29: 204.
- 31 Dominguez AR, Balkrishnan R, Ellzey AR, Pandya AG. Melasma in Latina patients: cross-cultural adaptation and validation of a quality-of-life questionnaire in Spanish language. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 59–66.
- 32 Lutfi RJ, Fridmanis M, Misiunas AL et al. Association of melasma with thyroid autoimmunity and other thyroidal abnormalities and their relationship to the origin of the melasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 28–31.
- 33 Perez M, Sanchez JL, Aguilo F. Endocrinologic profile of patients with idiopathic melasma. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 543–545.
- 34 Victor FC, Gelber J, Rao B. Melasma: a review. *J Cutan Med Surg* 2004; 8: 97–102.
- 35 Achar A, Rathi SK. Melasma: a clinico-epidemiological study of 312 cases. *Indian J Dermatol* 2011; 56: 380–382.
- 36 Sacre RC, Fernandes NC, Vaisman M, Tendrich M. Melasma idiopático: avaliação das funções tireoidiana, prolactínica e gonadal feminina. *An Bras Dermatol* 1996; 71: 195–198.
- 37 Sialy R, Hassan I, Kaur I, Dash RJ. Melasma in men: a hormonal profile. *J Dermatol* 2000; 27: 64–65.
- 38 Burkhart CG. Chloasma in a man due to oral hormone replacement. *Skinmed* 2006; 5: 46–47.
- 39 Hammer CJ. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *Northwest Med* 1968; 67: 251–254.
- 40 O'Brien TJ, Dyall-Smith D, Hall AP. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 1999; 141:592–593.
- 41 Sarkar R, Puri P, Jain RK, Singh A, Desai A. Melasma in men: a clinical, aetiological and histological study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 768–772.
- 42 Resnik SS. Melasma and other skin manifestations or oral contraceptives. *Trans N Engl Obstet Gynecol Soc* 1967; 21: 101–107.
- 43 Pichardo R, Vallejos Q, Feldman SR et al. The prevalence of melasma and its association with quality of life in adult male Latino migrant workers. *Int J Dermatol* 2009; 48: 22–26.
- 44 Ponzio HAS. Contribuição a classificação clínica e histopatológica dos melasmas. UFRGS, Porto Alegre, 1995.
- 45 Jee SH, Lee SY, Chiu HC, Chang CC, Chen TJ. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1407–1412.
- 46 Ranson M, Posen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones: in vitro studies with 1 alpha-25, dihydroxyvitamin D3, alpha-melanocyte stimulating hormone, and beta-estradiol. *J Invest Dermatol* 1988; 91: 593–598.
- 47 Resnik S. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *J Am Med Assoc* 1967; 199: 601–605.
- 48 Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2007; 39: 1443–1452.
- 49 Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoLB study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol* 2006; 156(Suppl 1): 13–20.
- 50 Diffey BL, Tate TJ, Davis A. Solar dosimetry of the face: the relationship of natural ultraviolet radiation exposure to basal cell carcinoma localization. *Phys Med Biol* 1979; 24: 931–939.
- 51 Ponzio HAS, Cruz MF. Acurácia do exame sob a lâmpada de Wood na classificação dos cloasmas. *An Bras Dermatol* 1993; 68: 325–328.
- 52 Sarvjit V, Sharma S, Mishra S, Singh A. Melasma: a clinicopathological study of 43 cases. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52: 357–359.
- 53 Mandry Pagan R, Sanchez JL. Mandibular melasma. *P R Health Sci J* 2000; 19: 231–234.

Anexo II – PROTOCOLO DE PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA EM MELASMA

Responsável: Profa. Luciane Bartoli Miot e Dra. Andréia de Almeida Tamega

Cole a etiqueta ou Preencha

RG:

Nome:

Sexo: ☐ M ☐ F

Data de Nascimento:..... /..... /.....

Telefone para Contato:

Procedência (Cidade):

Naturalidade (Cidade):

Profissão:

Fototipo: ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V ☐ VI Já Morou: ☐ Praia ☐ Sítio/FazendaLocais acometidos: ☐ Parotídea ☐ Zigoma ☐ Temporal ☐ Frontal ☐ Glabella ☐ Mandibular ☐ Labial Superior ☐ Mento ☐ Nasal ☐ Cervical ☐ MMSS ☐ Colo ☐ Orelhas ☐ OutroPadrão: ☐ Centro-Facial ☐ Malar ☐ Mandibular ☐ Difuso

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: AB:

Tratamentos já realizados	Sucesso/Insucesso

TSH: Cortisol basal:

Comentários: (No verso)

Anexo III – Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está convidado para participar da pesquisa intitulada “Estudo comparativo da imunohistoquímica e expressão de receptores de estrógeno no melasma e na pele sã” que objetiva esclarecer algumas características do melasma, manchas acastanhadas que acometem a pele. Para participação da pesquisa, serão retirados, sob anestesia local, 4 fragmentos de 2 mm cada, da sua pele na face, utilizando um punch, instrumento próprio p/ esse fim. Os fragmentos da sua pele serão obtidos tanto da pele com a mancha quanto da pele sadia ao redor (2 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 –UNESP. Caso novo projeto de pesquisa deseje estudar sua biópsia, você será novamente procurado para assinatura de novo termo de consentimento livre e esclarecido. Caso você apresente quaisquer complicações, receberá orientações e tratamentos adequados pelo responsável pela pesquisa. **É necessário esclarecer ainda que não haverá benefícios imediatos para você e que você não será remunerado pela participação nessa pesquisa.**

Você deverá comparecer ao retorno para retirada de pontos na face.

Você receberá o tratamento para suas manchas (melasma) considerado mais adequado a você. O tratamento incluirá fotoproteção associada a medicamentos tópicos, peelings e/ou lasers, de acordo com a avaliação clínica realizada pelo responsável pela pesquisa.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: 3811-6143.

Eu, _____, após ser devidamente esclarecida, inclusive sobre o risco de ficar com uma pequena cicatriz no local da retirada dos fragmentos de pele, aceito participar do projeto de pesquisa, podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar. Eu autorizo a retirada de fragmentos da minha pele. Também fui informada de que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Botucatu, _____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

Assinatura do Pesquisador:

Dra. Andréia de Almeida Tamega Dermatologista – CRM 107.772

Endereço: Rua Coronel Manoel Luis dos Santos, 421 apto. 31

Vila São Lúcio – Botucatu – SP CEP: 18603-310 Telefone: (14) 3815-4586

Anexo IV – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp  **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadora: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de dezembro de 2.009

OF. 453/2009-CEP

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

Prezada Drª Mariângela,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3389-2009) "Estudo comparativo da imunohistoquímica e expressão de receptores de estrógeno no melasma e na pele sã", a ser conduzido por Andréia de Almeida Tamega, orientada por Vossa Senhoria, co-orientada pela Drª Luciane Donida Bártoli Miot, com a participação dos Profs. Drs. Marcia Guimaraes da Silva e Hélio Amante Miot recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07 de dezembro de 2.009.

Enviar relatório dos 10 primeiros casos concluídos e posteriormente apresentar resultado do cálculo amostral para o estudo definitivo.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP