

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/05/2022.



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

Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos

**Avaliação da autofagia, senescência celular e
expressão de OPN3 na pele com melasma em
comparação com a pele sã adjacente**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

**Botucatu
2020**

Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos

Avaliação da autofagia, senescência celular
e expressão de OPN3 na pele com melasma
em comparação com a pele sã adjacente

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lemos, Ana Cláudia Cavalcante Espósito.

Avaliação da autofagia, senescência celular e expressão de OPN3 na pele com melasma em comparação com a pele sã adjacente / Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Hélio Amante Miot
Capes: 40101029

1. Distúrbios de pigmentação da pele. 2. Melanose. 3. Autofagia. 3.Senescência celular. 4. Imunofluorescência.

Palavras-chave: Melasma; Imunofluorescência direta; Histologia; Pigmentação da Pele; Senescência celular.

Dedicatória

A minha família

Ao nosso filho, Francisco, por ser a Luz da nossa família e nos transbordar de amor a cada sorriso.

Ao meu marido, Felipe, por ser meu grande companheiro e incentivador. Sempre foi fortaleza, acalento e suporte. Juntos, vivemos os momentos mais felizes (e também os difíceis) de nossas vidas. Compartilhamos, de maneira intensa e simultânea, as conquistas e dificuldades inerentes aos nossos doutorados;

Aos meus pais, Ione e Wagner, por sempre acreditarem que Educação era o que de melhor poderiam me prover. Esta tese é, em algum grau, a maior manifestação de gratidão com a qual poderia retribuí-los.

A minha irmã, Maria Clara, por todo amor e admiração, que são recíprocos. Espero que seu caminho na Medicina seja sempre instigante e que você se apaixone a cada dia pela profissão que escolheu.

Agradecimento especial

A Deus, por guiar nossa caminhada e permitir que este trabalho se concretizasse.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Amante Miot, por seu entusiasmo com a pesquisa e com a Ciência. Tenho orgulho de ser sua orientada e poder aprender a cada conversa. Obrigada, professor, por todas as oportunidades; espero continuar pesquisando e aprendendo em muitos outros projetos.

Agradecimentos

Às pacientes participantes do estudo, por acreditarem na relevância da nossa pesquisa e efetivamente doarem uma parte de si para que ele fosse possível.

À Dra. Luciane Miot, pelo auxílio no planejamento do estudo, pela leitura atenta dos manuscritos e por ser uma inspiração como dermatologista e pesquisadora.

À Nathália Souza, pelo empenho em padronizar as imunofluorescências e, principalmente, por trabalhar com tanto carinho nesta pesquisa. Admiro sua trajetória e a profissional capacitada que se tornou.

Aos docentes, médicos contratados, médicos colaboradores, funcionários, biólogas, fotógrafa e médicos residentes do Departamento de Dermatologia e Radioteria da Faculdade de Medicina de Botucatu, por terem feito parte da minha formação e me fazerem sentir diariamente saudade de Botucatu.

A minha banca de qualificação, Profa. Dra. Luciana Abbade e Prof. Dr. Juliano Schmitt, pela leitura atenta e contribuições fundamentais ao texto final.

Ao colega dermatologista e companheiro de doutorado, Daniel Cassiano, por todo trabalho em equipe que desenvolvemos ao longo desses anos.

Às dermatologistas Paula Basso e Joana Alexandria, pelo empenho e por estarem sempre dispostas a novas pesquisas.

Aos Drs. Edileia Bagatin, Karime Hassum, Mariana Lima e Emerson Lima, pela confiança e oportunidade de aprender com vocês.

Ao funcionário do Laboratório Toxican, Paulo, pela confecção dos blocos de

parafina e lâminas.

À fotógrafa Eliete Soares, pelos seus registros através das lentes, especialmente nas pesquisas desenvolvidas paralelamente a este projeto.

Aos meus amigos Marília, Luiz Antônio, Ana Paula, Julcy, Maria Laura, por me receberem em suas casas durante as disciplinas da Pós-Graduação; pelos almoços às quintas-feiras e, principalmente, por toda torcida.

À secretária do programa de pós-graduação em Patologia, Vânia Soler, por toda atenção, agilidade, solicitude e carinho.

Ao Fundo de apoio à Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio (FUNADERSP), pelo fomentando à pesquisa na dermatologia. Sem ele, esse projeto não se concretizaria.

Resumo

Melasma é uma doença crônica, que acomete principalmente mulheres durante o menacme. As lesões ocorrem exclusivamente em áreas fotoexpostas (especialmente a face), sendo a radiação ultravioleta (RUV) o principal desencadeante da doença. A luz visível, especialmente luz azul (420-490nm), também induz pigmentação melânica. A hiper melanogênese que ocorre no melasma pode ser entendida como um mecanismo de defesa contra o dano oxidativo e lesão de organelas promovidos pela RUV. O sistema autofágico celular, em que participam as proteínas LC3B e p62, tem a função de eliminar as organelas disfuncionais. Fibroblastos participam da regulação da melanogênese; a transição para um perfil senescente modifica o padrão das citocinas por eles secretadas, favorecendo o desencadeamento do melasma. Este estudo objetivou (1) avaliar a ocorrência de receptor para luz visível (OPN3) e (2) marcadores de autofagia (LC3B e p62) nos melanócitos, queratinócitos e fibroblastos da pele com melasma facial de mulheres, comparada à pele sã adjacente; além de (3) explorar o papel dos fibroblastos na patogênese da doença, tendo como foco a morfologia, taxa de crescimento e expressão gênica na pele com melasma em comparação com a pele adjacente. Foram biopsiadas 30 mulheres com melasma facial (*punch* 3 mm) em duas áreas distintas: melasma e pele adjacente. Fragmentos oriundos de 20 participantes foram submetidos à imunofluorescência de tripla marcação: (a) anti-OPN3, anti-vimentina e DAPI; (b) anti-LC3B, anti-vimentina e DAPI e (c) anti-p62, anti-vimentina e DAPI. Foram cultivados os fibroblastos de cinco participantes, dos dois sítios de análise (melasma e pele sã), e avaliada a senescência pelo marcador SA- β -gal. Por fim, os fibroblastos cultivados de outras cinco participantes foram submetidos a PCR em tempo real. Identificaram-se receptores de OPN3, p62 e LC3B nos queratinócitos, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior. Apenas LC3B apresentou expressão diferencial, uma vez que melanócitos da camada basal da pele com melasma apresentaram redução deste marcador ($p=0,025$) em relação à pele sã adjacente. A cultura primária de fibroblastos da pele com melasma teve morfologia menos fusiforme, com proporção 34% maior (IC 95% 4-63%) de células senescentes, além de menor taxa de crescimento ($p<0.01$) em comparação com a cultura da pele sã. Os genes WNT3A, EDN3, ESR2, PTG2, MMP1 e SOD2 estavam hiperexpressos nos fibroblastos da pele com melasma, enquanto COL4A1, CSF2, DKK3, COL7A1, TIMP4, CCL2 e CDH11 foram menos expressos. Estes resultados sugerem que a expressão de OPN3 não justifica a diferença de pigmentação cutânea no melasma. Caso a luz visível apresente um papel importante na sua patogênese, ela não o exerce em função da expressão de OPN3. A redução de LC3B nos melanócitos basais da pele com melasma indica um déficit de autofagia nestas células, o que altera o perfil de citocinas secretadas para um polo pró-inflamatório e promove o acúmulo de melanina nos melanossomas. Fibroblastos da pele com melasma apresentam fenótipo senescente, com perfil de genes associado a fatores pró-inflamatórios, melanogênicos e de déficit de reparo.

Palavras-chave: melasma, luz visível, raios ultravioleta, autofagia, microscopia de imunofluorescência, opsinas de bastonetes, senescência celular.

Abstract

Melasma is a chronic disease, which mainly affects women during menacme. The lesions occur exclusively in sun exposed areas - especially on the face - and ultraviolet radiation (UVR) is the main trigger. Visible light, mostly blue light (420-490nm), also induces melanic pigmentation. The hypermelanogenesis that occurs in melasma skin can be understood as a defense mechanism against oxidative damage and organelle damage promoted by UVR. The autophagic cell system, in which the LC3B and p62 proteins participate, acts promoting elimination of dysfunctional organelles. Fibroblasts participate in the melanogenesis regulation, and the transition to a senescent profile changes the pattern of cytokines, favoring the triggering of melasma. This study aimed (1) to evaluate the occurrence of visible light receptor (OPN3) and (2) autophagy markers (LC3B and p62) in melanocytes, keratinocytes and fibroblasts from women facial melasma skin compared to adjacent healthy skin; in addition to (3) exploring the role of fibroblasts in the disease pathogenesis, focusing on the morphology, growth rate, and gene expression profile in melasma skin compared to healthy skin. Thirty women with facial melasma were biopsied (punch 3mm) in two different areas: Melasma and healthy adjacent skin. Fragments from 20 participants were submitted to triple-labeled immunofluorescence: (a) anti-OPN3, anti-vimentin and DAPI; (b) anti-LC3B, anti-vimentin and DAPI and (c) anti-p62, anti-vimentin and DAPI. The fibroblasts from five participants (melasma and healthy skin) were cultured, and senescence was assessed by using the marker SA- β -gal. Finally, fibroblasts cultured from five other participants underwent real-time PCR. OPN3, p62 and LC3B receptors were identified in keratinocytes, basal layer melanocytes, pendulum melanocytes and upper dermis fibroblasts. Only LC3B showed differential expression, in which basal layer melanocytes in melasma skin showed a reduction in this marker ($p=0.025$) in relation to healthy adjacent skin. The primary culture of skin fibroblasts with melasma had less fusiform morphology, with a 34% higher proportion (95% CI 4-63%) of senescent cells, in addition to a lower growth rate ($p < 0.01$) compared to the skin culture healthy. The WNT3A, EDN3, ESR2, PTG2, MMP1 and SOD2 genes were upregulated in skin fibroblasts with melasma, while COL4A1, CSF2, DKK3, COL7A1, TIMP4, CCL2 and CDH11 were downregulated. These results suggest that the expression of OPN3 does not justify the difference in skin pigmentation in melasma. If visible light presents an important role in its pathogenesis, it is not due to the expression of OPN3. The reduction of LC3B in basal melanocytes of melasma skin indicates a deficit of autophagy in these cells, which changes the profile of secreted cytokines released to a pro-inflammatory pattern and promotes the accumulation of melanin in melanosomes. Fibroblasts from melasma skin have a senescent phenotype, with a gene profile associated to proinflammatory, melanogenic and repair deficit factors.

Key-words: melasma, visible light, ultraviolet rays, autophagy, immunofluorescence microscopy, rod opsins, senescência celular.

Lista de abreviaturas / siglas

α -MSH – hormônio estimulador de melanócito- α ;
AT – ácido tranexâmico;
bFGF – *basic fibroblast growth factor*;
BMZ – *basement membrane zone*;
CCL2 – *C-C Motif Chemokine Ligand*;
CDH – *Cadherin*;
COL – *Collagen*;
CSF – *Colony Stimulating Factor*;
Cxcl – CXC ligantes;
DLQI – *Dermatology Life Quality Index*;
EDN – *Endothelin*;
ESR – *Estrogen Receptor*;
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio;
HGF – *hepatocyte growth factor*;
iNOS – *inducible nitric oxide synthase*;
KGF – *keratinocyte growth factor*;
LV – luz visível;
MAPKs – *mitogen-activated protein kinase*;
MASI – *Melasma Area Severity Index*;
MC1-R – receptor de melanocortina-1;
MELASQoL – *Melasma Quality of Life Scale*;
MITF – fator de transcrição associado à microftalmia;
mMASI – *modified Melasma Area Severity Index*;
MMP – metaloproteinase;
NF- κ B – *factor nuclear kappa B*;
NRF2 – *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*;
OPN – opsina ou panopsina;
PGE2 – *prostaglandin E2*;
PTG – *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase*;
RUV – radiação ultravioleta;
SA- β -gal – *Senescence β -Galactosidase*;
SAASP – *skin aging-associated secreted proteins*;
SCF – *stem cell factor*;
SDF1 – *stromal derived factor-1*;
SOD – *superoxide dismutase*;
TGF β 1 – *transforming growth factor beta 1*;
TIMP – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*;
UV – ultravioleta;
UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho;
UVA – radiação ultravioleta do tipo A;
UVA1 – radiação ultravioleta do tipo A1;
UVB – radiação ultravioleta do tipo B;
VEGF – *vascular endothelial growth factor*;
ZMB – zona da membrana basal.

Sumário

Introdução	11
Objetivos	28
Primeiro Manuscrito.....	29
Segundo Manuscrito.....	36
Terceiro Manuscrito.....	48
Conclusões.....	64
Perspectivas	65
Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
Apêndice 2. Protocolo e controles da imunofluorescência de tripla marcação por anti-OPN3, anti-vimentina, DAPI	68
Apêndice 3. Avaliação de OPN3 através do <i>software ImageJ</i>	70
Apêndice 4. Protocolo e controle da imunofluorescência de tripla marcação por anti-LC3B, anti-vimentina, DAPI	75
Apêndice 5. Protocolo e controles da imunofluorescência de tripla marcação por anti-p62, anti-vimentina, DAPI	77
Apêndice 6. Avaliação de LC3B através do <i>software ImageJ</i>	79
Apêndice 7. Avaliação de p62 através do <i>software ImageJ</i>	84
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	87
Anexo 2. Produção científica durante o doutorado.....	89

Introdução

O melasma é uma desordem pigmentar crônica e adquirida, que ocorre exclusivamente em áreas fotoexpostas.(1) As lesões são máculas acastanhadas a enegrecidas, simétricas, de limites nítidos e contornos irregulares (**Figura 1**). A face é a localização mais comum, mas o melasma também pode acometer os braços, antebraços, pescoço e região esternal (melasma extrafacial).(2) As lesões faciais podem, ainda, ser subclassificadas em centofaciais (máculas na glabella, fronte, nariz, lábio superior e mento), periféricas (comprometimento frontotemporal, pré-auricular e dos ramos mandibulares) ou mistas.(1)



Figura 1 – Melasma facial. (Arquivo pessoal dos pesquisadores).

O melasma configura o sétimo diagnóstico mais comum nos consultórios dermatológicos brasileiros, segundo censo realizado em 2018, e sua prevalência é maior no sexo feminino (um homem acometido para nove mulheres).(3) Estimativas

apontam que 15 a 35% das mulheres brasileiras adultas têm a doença e mais de 50% das pacientes desenvolvem as lesões entre 20 e 35 anos (menacme).(2,4,5)

Mulheres de fototipos III a V de Fitzpatrick são mais acometidas e 40-60% das pacientes apresentam antecedente familiar positivo para a dermatose.(1) Logo, há uma evidente suscetibilidade genética, que apresenta um padrão de segregação dominante.(6) Em uma população com elevada miscigenação - como a brasileira - a ancestralidade africana é um fator de risco independente para desenvolver melasma facial.(7)

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) é o principal fator desencadeante, o que justifica o curso natural da doença - piora durante os meses de verão e certa melhora espontânea durante os meses menos ensolarados.(1,8) Tanto a radiação ultravioleta do tipo A (UVA) quanto a do tipo B (UVB) estimulam diretamente os melanócitos da camada basal da epiderme, mas também induzem pigmentação ao promover liberação indireta de fatores melanogênicos pelos fibroblastos e queratinócitos.(9) A luz visível também promove pigmentação melânica nas peles mais pigmentadas, além de induzir maior proeminência nos dendritos dos melanócitos; entretanto, seu papel exclusivo no melasma ainda não é completamente definido.(10)

Outros fatores de risco são a gestação, uso de contraceptivo oral combinado, terapia de reposição hormonal, tumores ovarianos, medicações fotossensibilizantes (como fenitoína) e cosméticos.(1)

O diagnóstico do melasma é eminentemente clínico, entretanto a utilização da Lâmpada de Wood, dermatoscopia e microscopia confocal de reflectância podem ser ferramentas úteis. As lesões se tornam mais perceptíveis quando analisadas sob exposição à luz ultravioleta (Luz de Wood), o que permite, inclusive, o diagnóstico de lesões ainda subclínicas, incipientes ou a avaliação da real extensão das máculas.(11)

À dermatoscopia, os principais achados são uma pseudorrede pigmentar difusa, coloração de fundo marrom clara a escura, múltiplos pontos marrons, glóbulos, estruturas arciformes perifoliculares, hipocromia ao redor dos folículos, áreas vermelhas homogêneas e telangiectasias (**figura 2**).(12) Ainda faltam estudos que

correlacionem os achados dermatoscópicos do melasma com sua gravidade clínica e alterações histopatológicas. Já à microscopia confocal, é possível quantificar a melanina epidérmica, além de visualizar nas camadas granular, espinhosa e basal um aumento no padrão de “pedra de calçamento” (*cobblestone*); na camada espinhosa, estão presentes numerosas células contendo melanina com ramificação simples correlacionada com os dendritos dos melanócitos e, por fim, na derme superior podem ocorrer agregados de células redondas a triangulares, correspondendo aos melanófagos (**figura 3**).⁽¹³⁾

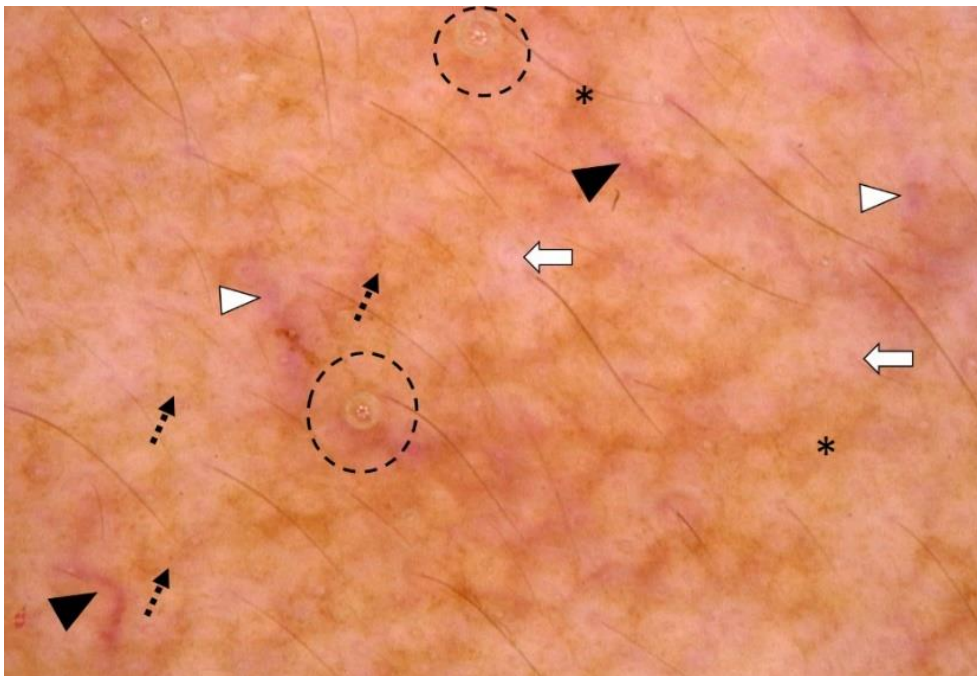


Figura 2 – Dermatoscopia do melasma. Presença de pseudorrede pigmentar difusa marrom (asterisco), áreas vermelhas homogêneas (triângulo branco), telangiectasias (triângulo preto), hipopigmentação perifolicular (seta branca), pontos marrons (seta preta tracejada), plugs foliculares (circunferência tracejada). (Arquivo pessoal dos pesquisadores).

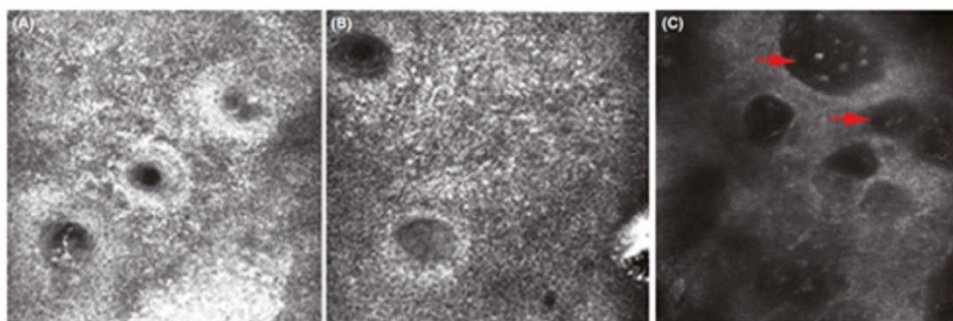


Figura 3 – Pele com melasma à microscopia confocal. Há, na epiderme, um incremento no padrão *cobblestone* (A), além de ramificações arquiteturais relacionadas aos dendritos de melanócitos (B). Na derme superior, há melanófagos (C – setas vermelhas).(13)

A qualidade de vida dos pacientes - que é entendida como um processo dinâmico de percepção individual em um momento específico – apresenta um grande comprometimento em pacientes com melasma, pois as lesões ocorrem em áreas visíveis (especialmente a face) e os tratamentos disponíveis não promovem a cura.(2,14)

O MELASQoL (*Melasma Quality of Life Scale*) foi desenvolvido tendo como base o SKINDEX-16 e o DLQI (*Dermatology Life Quality Index*); consiste em 10 perguntas que buscam avaliar a qualidade de vida relacionada ao melasma, já tendo sido validado no Brasil (**tabela 1**). (15–17) O MELASQoL é considerado o instrumento psicométrico mais específico na avaliação da qualidade de vida de pacientes com melasma.(14)

Especialmente no âmbito da pesquisa científica, utiliza-se o MASI (*Melasma Area Severity Index*) e, mais recentemente, o mMASI (*modified Melasma Area Severity Index*) para avaliação da extensão e gravidade do melasma (**Quadro 1**). (18) Há uma baixa correlação entre MELASQoL e a gravidade clínica das lesões (avaliada pelo MASI), o que sinaliza para um sofrimento psíquico decorrente das lesões.(14,19) A percepção do comprometimento da qualidade de vida é influenciada por diversos fatores, sendo a baixa escolaridade, baixa renda familiar, não estar casado, além da própria gravidade clínica, os preponderantes.(14)

Tabela 1 – MELASQoL validado no Brasil. Tal escala é constituída por 10 perguntas, com pontuação de 1 a 7 por questão. Scores maiores indicam maior comprometimento na qualidade relacionado ao melasma.(20)

Considerando a sua doença, melasma, na última semana antes desta consulta, como você se sente em relação a:	Nem um pouco incomodado	Não incomodado na maioria das vezes	Não incomodado algumas vezes	Neutro	Incomodado algumas vezes	Incomodado na maioria das vezes	Incomodado todo o tempo
1. A aparência da sua pele	1	2	3	4	5	6	7
2. Frustração pela condição da sua pele	1	2	3	4	5	6	7
3. Constrangimento pela condição de sua pele	1	2	3	4	5	6	7
4. Sentindo-se depressivo pela condição da sua pele	1	2	3	4	5	6	7
5. Os efeitos da condição da sua pele no relacionamento com outras pessoas (por ex: interações com a família, amigos, relacionamentos íntimos, etc.)	1	2	3	4	5	6	7
6. Os efeitos da condição da sua pele sobre o seu desejo de estar com as pessoas	1	2	3	4	5	6	7
7. A condição da sua pele dificulta a demonstração de afeto	1	2	3	4	5	6	7
8. As manchas da pele fazem você não se sentir atraente para os outros	1	2	3	4	5	6	7
9. As manchas da pele fazem você se sentir menos importante ou produtivo	1	2	3	4	5	6	7
10. As manchas da pele afetam o seu senso de liberdade	1	2	3	4	5	6	7

Quadro 1. mMASI. Esquema de cálculo do índice de gravidade do melasma simplificado. O score varia de 0 a 24 e quanto maior, sinaliza maior gravidade clínica.(19)

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

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

Infelizmente, ainda não há um tratamento curativo para o melasma e as recidivas são frequentes. A associação de um filtro solar com cor (aplicação a cada 3 horas) à tripla combinação (hidroquinona 4%, tretinoína 0,05%, fluocinolona acetona 0,01%) de uso noturno ainda é a terapêutica mais efetiva e bem estudada.(21)

Dentre os tratamentos orais disponíveis, o uso de antioxidantes potentes (como o picnogenol) e ácido tranexâmico são promissores.(22) *Peelings* químicos, *lasers* e terapias com luz (como luz intensa pulsada) são consideradas terceira linha

de tratamento, com ação inferior aos tratamentos tópicos domiciliares e com maior risco de efeitos colaterais.

Dentre os procedimentos que podem ser associados, o microagulhamento (protocolo de injúria moderada) é o que apresenta maiores evidências de benefício, justamente por induzir melhora clínica (redução do mMASI) e histológica (diminuição da melanina epidérmica, redução no número de áreas fragmentadas na ZMB e aumento do colágeno na derme superior).(23,24)

Tendo em vista que o foco desta tese envolve os mecanismos fisiopatológicos da doença, apresentaremos uma imersão neste tópico.

Fisiopatologia do melasma

Apesar da fisiopatologia do melasma ainda não ser totalmente compreendida, já é bem estabelecido que ela não se deve exclusivamente a uma hipertrofia dos melanócitos, mas a alterações histológicas e funcionais complexas e inter-relacionadas envolvendo as unidades epidermo-melânicas, zona da membrana basal (ZMB) e derme superior.(25,26)

A pele com melasma, em relação à pele adjacente sã, apresenta aumento da densidade de melanina na epiderme (**figura 4**), melanócitos hipertrofiados e hiperfuncionantes, além de melanossomas maiores e mais maduros.(27) A camada córnea apresenta-se compactada (desordem estrutural) em até 90% dos pacientes e com alteração em sua composição lipídica (desordem funcional), e ambas alterações deflagram dano à função de barreira cutânea (**figura 5**).(28–31)

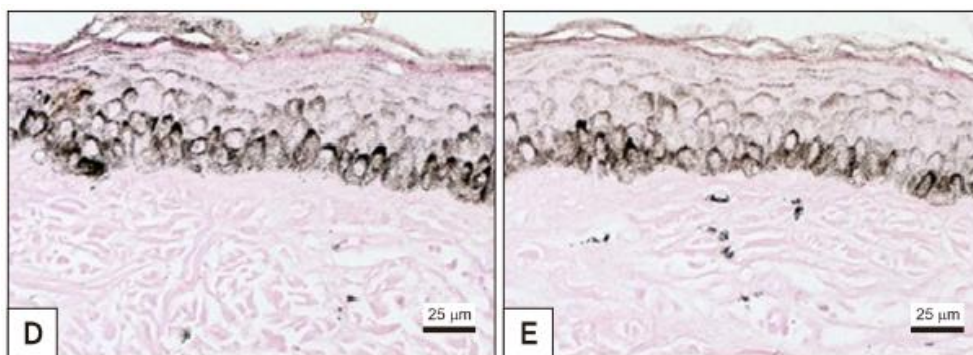


Figura 4 – Maior concentração de pigmento melânico na epiderme do melasma (D) do que na pele adjacente sã (E) - Fontana-Masson.(31)

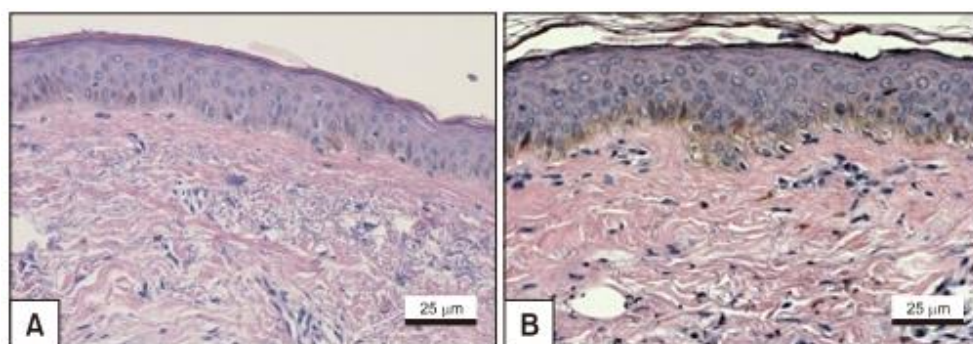


Figura 5 – Camada córnea do melasma (A) com evidente compactação, em relação à pele sã adjacente (B) - Hematoxilina-Eosina.(31)

Não há diferença na densidade de melanócitos da pele com melasma *versus* pele sã, entretanto há aumento de melanócitos em pêndulo (melanócitos da camada basal que se projetam em direção à derme superior) na pele acometida. A RUV (especialmente a UVA) parece ser a agente desencadeante do surgimento de tais células, ao promover aumento da metaloproteinase (MMP) 2 e 9, que degradam o colágeno tipo IV e VI.(31,32) Os melanócitos em pêndulo são característicos da dermatose, entretanto seu significado clínico ainda não é claro (**figura 6**). (30,33)

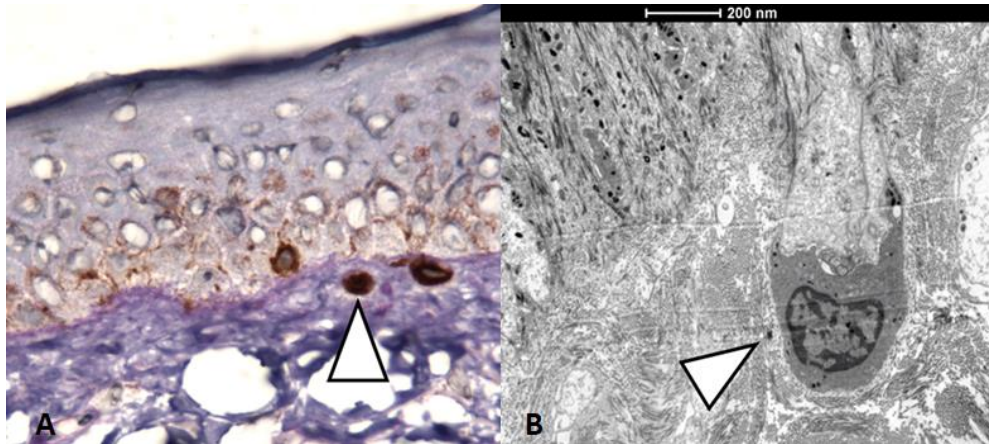


Figura 6 – A. Seta branca apontando um melanócito em pêndulo na pele com melasma (Ácido Periódico de Schiff). **B.** Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando um melanócito da camada basal se projetando em direção à derme (melanócito em pêndulo) – seta branca.(33)

A ZMB do melasma apresenta maior número de rupturas e lacunas, além de perda estrutural da *lamina densa* e de fibrilas de ancoragem da *lamina lucida* (**figura 7**). (33) As áreas que concentram os melanócitos em pêndulo apresentam total descontinuidade da ZMB e tal dano facilita o tráfego de citocinas dérmicas aos melanócitos, o que aumenta a síntese de melanina. (30,32)

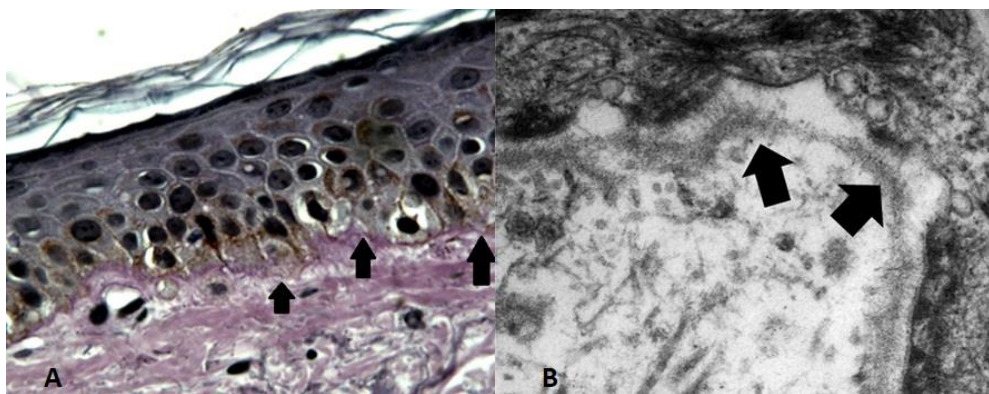


Figura 7 – A. Ruptura e fragmentação da ZMB – setas pretas (Ácido Periódico de Schiff). **B.** À microscopia eletrônica de transmissão, a área entre as setas pretas apresenta um afinamento da *lamina densa* e perda de fibrilas de ancoragem da *lamina lucida*. (33)

A exposição à RUV, principalmente UVA, promove um microambiente inflamatório no melasma com liberação de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, além de aumentar a densidade de células na derme superior.(6,33,34) Além disso, a elastose solar é pronunciada, sendo moderada a grave em 88% dos casos (figura 8).(30)

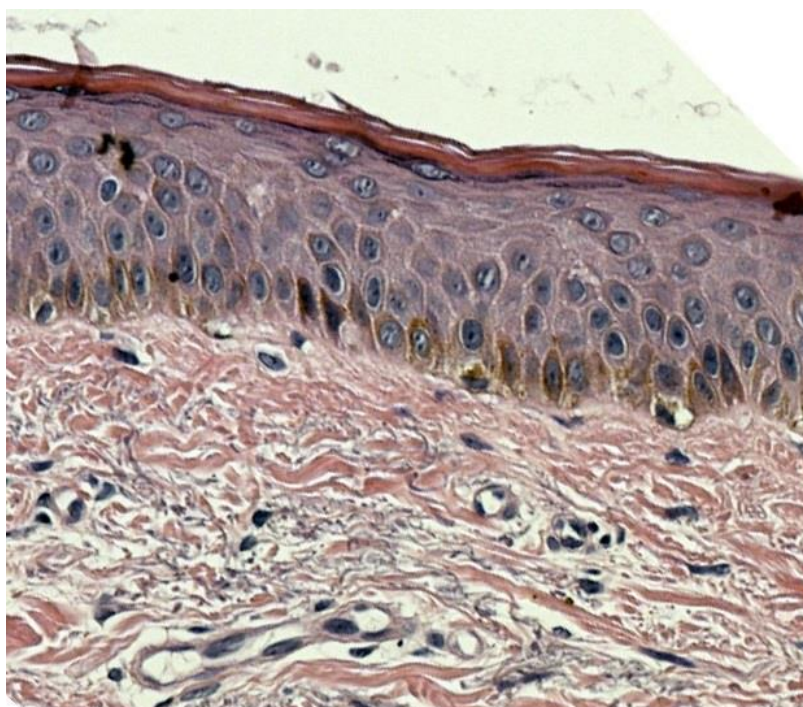


Figura 8 – Elastose solar acentuada na derme superior do melasma (Hematoxilina-Eosina, 400x). Arquivo dos pesquisadores.

Diversos agentes, como o fator de crescimento de fibroblasto, interleucina-8, endotelina-1, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e a RUV, promovem síntese de vasos no melasma e esta é uma alteração precoce na doença (figura 9).(25) O componente vascular, além da relevância fisiopatológica, tem ganhado destaque como um dos possíveis alvos terapêuticos no melasma: o ácido tranexâmico - um derivado sintético do aminoácido lisina - se liga ao plasminogênio e inibe a conversão em plasmina e, dentre as suas diversas atuações, inibe o fator de crescimento de fibroblasto, consequentemente diminuindo a síntese de vasos.(22)

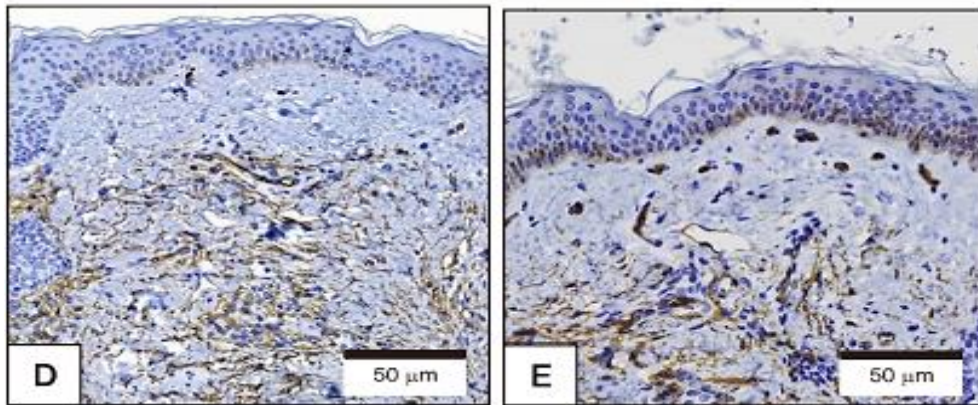


Figura 9 – Marcação por CD38 evidenciando o componente vascular mais exuberante na pele com melasma (D) do que na pele sã adjacente (E).(31)

O número de mastócitos também está aumentado no melasma (**figura 10**). A histamina liberada por estas células é uma ativadora direta da melanogênese ao se ligar ao receptor H2 e ativar a enzima tirosinase.(35,36) A triptase, também liberada, ativa precursores de MMPs que, quando ativas, degradam o colágeno tipo IV e contribuem para o dano à ZMB, além de induzir síntese de elastina pelos fibroblastos e participar da gênese da elastose solar.(25,36) Os mastócitos também influenciam a síntese de vasos ao secretar VEGF e fator de crescimento de fibroblasto.(25,36)

Citocinas e fatores de crescimento (interleucina 1 α , interleucina 6, angiopoietina e adipoquinina) secretados pelos sebócitos exercem ação parácrina nos melanócitos e, quando tais células são cocultivadas, há maior formação de dendritos nos melanócitos e a melanogênese é alterada.(37–39) Apesar do papel dos sebócitos não estar bem delimitado no melasma, é plausível que também participem das interações intrínsecas da doença.

Apesar do uso da tripla combinação associada ao fotoprotetor ser ainda a estratégia dominante no tratamento do melasma, terapêuticas que têm como foco também a reparação histológica – como o microagulhamento - parecem ser promissoras.(24,33) Sete dias após microagulhamento com protocolo de injúria moderada, já ocorre uma redução significativa na densidade de melanina epidérmica, nos melanócitos em pêndulo e nos danos da ZMB, além de maior deposição subepidérmica de substâncias extracelulares – como glicosaminoglicanas e fibrina – e proliferação de fibroblastos.(40)

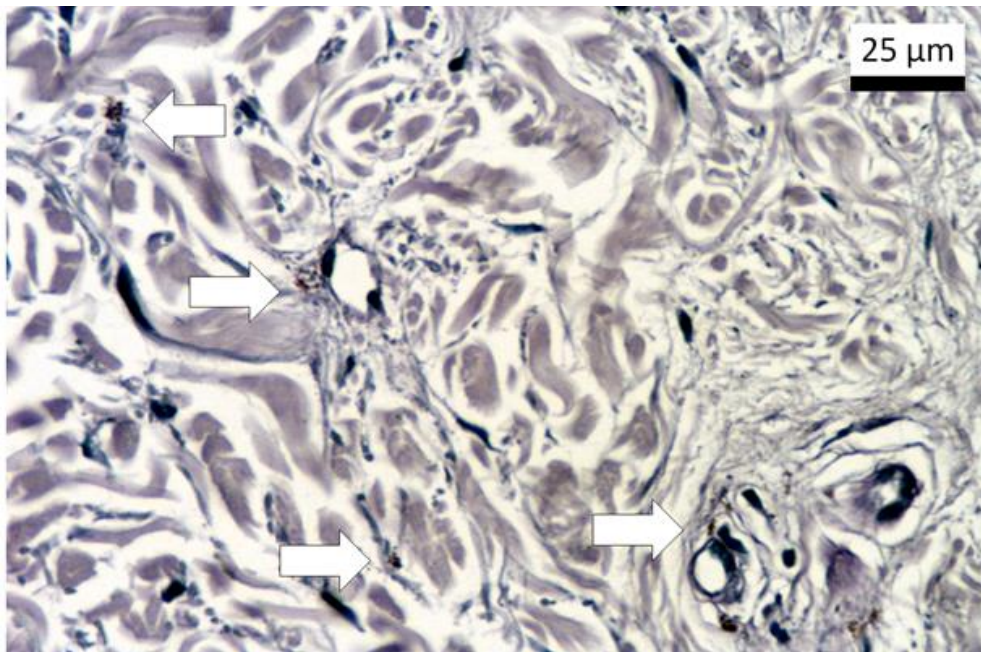


Figura 10 - Mastócitos (setas brancas) de distribuição perivascular no melasma.(30)

O estudo proteômico comparativo entre melasma e pele sã identificou 256 proteínas, sendo 29 delas com expressão diferencial entre as topografias (25 super-reguladas e 4 subreguladas), sendo que estas participam de funções ligadas à glicólise, gliconeogênese, fenômenos de transporte celular, hemostasia, coagulação, resposta a estímulos externos, reparo e cicatrização.(41)

Dentre as alterações que ocorrem na pele com melasma, a RUV é o principal estímulo extrínseco à pigmentação, especialmente ao induzir *upregulation* do receptor de melanocortina-1 (MC1-R) e do hormônio estimulador de melanócito- α (α -MSH). Como consequência, há aumento da proteína *kinase* A e, em via final, da tirosinase, enzima-chave da eumelanogênese.(36,42)

A pele com melasma apresenta aumento dos receptores de estrógeno β (epiderme e derme) e progesterona nos núcleos dos queratinócitos, o que corrobora a maior prevalência da doença em mulheres em idade reprodutiva e a relação entre o desencadeamento e uso de contraceptivo, gestação e terapia de reposição hormonal.(43)

A via Wnt/ β -catenina participa da diferenciação e desenvolvimento de

melanócitos da crista neural, bem como da melanogênese.(44) Wnt1 é proeminente na epiderme do melasma, mas não na derme, sugerindo sua participação no processo de reparo tecidual que pode sustentar a melanogênese epidérmica e a transferência de melanossomas.(42)

A melanogênese pode ser também entendida como um mecanismo de defesa da célula contra o dano oxidativo e lesão de organelas.(45) Neste contexto, a p38 – proteína *kinase* que responde a múltiplos estímulos de estresse, como RUV, citocinas inflamatórias, alterações osmóticas e de temperatura – apresenta-se aumentada na derme superior do melasma e não se expressa na epiderme, sugerindo um microambiente inflamatório na derme superior que pode propiciar estímulo de apoptose, autofagia e senescência celular.(42,46)

Luz visível e melasma

A RUV é o principal estímulo à pigmentação no melasma, mas a participação da luz visível no desencadeamento da doença tem sido progressivamente mais questionada. Sabe-se que a luz visível (comprimento de onda de 400 a 700nm) tem capacidade de promover pigmentação, entretanto em menor intensidade do que a RUV e apenas nos indivíduos de maior fototipo.(47–49) Tanto a pele com melasma quanto a pele normal adjacente apresentam melanogênese efetiva na camada basal quando irradiadas com UVA, UVB e luz visível (*ex vivo*), entretanto sem diferença significativa quanto ao local anatômico.(10)

A luz azul (comprimento de onda de 420 a 490nm) é a principal componente do espectro visível a induzir da pigmentação. A opsina 3 (OPN3) é um fotorreceptor acoplado à proteína G e é o principal receptor da luz azul na pele. Outras quatro opsinas já foram previamente descritas, mas a OPN3 é a forma mais expressa em melanócitos e queratinócitos.(50)

Quando ativado nos melanócitos, OPN3 promove a fosforilação do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), resultando na ativação da tirosinase. Até o momento, não foi investigada a expressão de OPN3 na pele com melasma em comparação com a pele adjacente.(50)

Dispositivos eletrônicos - telas dos aparelhos celulares, televisão e computador – também emitem luz visível, apesar da menor intensidade do que a emissão solar. Entretanto, exposição a uma tela de computador, com distância de 20 cm, 8 horas por dia, 5 dias da semana, não é capaz de agravar o melasma. Exposições mais longas ou mais intensas que estas ainda não foram sistematicamente testadas.(51)

Autofagia e senescência celular

O sistema autofágico tem a função de eliminar as macromoléculas citoplasmáticas e as organelas disfuncionais, sendo essencial para a homeostase tissular, adaptação à privação de nutrientes e remoção de patógenos.(52,53) A LC3, uma proteína semelhante à ubiquitina, é uma das proteínas que participa do complexo sistema de autofagia e se mantém durante todo o processo ligada à parede das vesículas de degradação que são formadas (autofagossomos e autolisossomos), o que facilita, laboratorialmente, a identificação do processo de autofagia (**figura 11**). (54) A proteína p62 (também chamada de SQSTM1) é responsável por fazer a ligação entre os agregados proteicos ubiquitinados (marcados como indesejados pelas proteínas ubiquitinas) e a maquinaria autofágica. A p62 é degradada pelo LC3 durante o processo; portanto, quando a autofagia está estimulada, reduz-se os níveis de p62.(55)

Por participar da degradação dos melanossomas danificados, local de síntese de melanina, a ativação do sistema de autofagia influencia a pigmentação da pele.(52,56) Culturas *ex vivo* de pele humana apresentam diminuição dos níveis de melanina quando tratadas com agentes ativadores da autofagia; já quando utilizados inibidores, há aumento da pigmentação.(56) Além disso, os queratinócitos de caucasianos apresentam uma maior atividade autofágica do que dos afro-americanos.(56) Nos queratinócitos da pele com melasma, há um aumento na expressão de arginase-2 – um inibidor da autofagia -, entretanto ainda não se conhece se há diferenças na autofagia que ocorre nos melanócitos da pele com melasma em comparação ao processo autofágico dos melanócitos da pele

adjacente.(57)

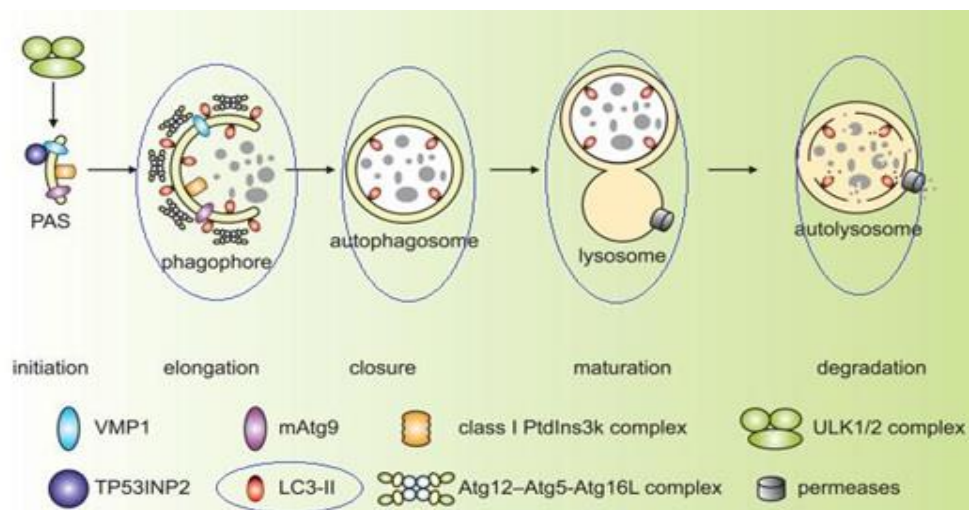


Figura 11 – Durante a autofagia, há formação de vesículas sequenciais para degradação do conteúdo intracelular disfuncional. A proteína LC3 se mantém, durante todo o processo, ligada à membrana das vesículas.(54)

A RUV induz um fenótipo senescente nos fibroblastos e estes aumentam a taxa de proteínas secretadas associadas ao envelhecimento (SAASP, *skin aging-associated secreted proteins*). (58,59) Dentre as SAASP, há citocinas melanogênicas como *stem cell factor*, fator de crescimento de queratinócitos e fator de crescimento de melanócitos. (60) A cultura primária de fibroblastos oriundos da pele com melasma apresenta células menos fusiformes e com curva de crescimento menos inclinada do que a cultura de fibroblastos da pele são adjacente; além disso, há maior expressão de IL-6 e MMPs (1, 7 e 9), além de redução na expressão de colágeno IV. (61)

Os fibroblastos da pele com melasma apresentam maior expressão de p16 – um marcador de senescência – do que os da pele são adjacente, sinalizando um possível envolvimento da senescência na fisiopatologia do melasma. (34,59) Entretanto, até o momento não foi investigado o papel dos melanócitos e queratinócitos neste contexto de envelhecimento celular.

Além de complexa e não totalmente elucidada, a fisiopatologia do melasma envolve interação entre as células da epiderme (unidade epidermomelânica) e da derme superior, cuja comunicação mediante citocinas é facilitada pela perda de

integridade da ZMB. Neste contexto, o fenótipo senescente e com déficit de autofagia parece contribuir sobremaneira; entretanto, os tipos celulares envolvidos e as interrelações existentes ainda não são conhecidos.

Referências

1. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*. 2014;89(5):771–82.
2. Tamega A de A, Miot LDB, Bonfietti C, Gige TC, Marques MEA, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(2):151–6.
3. Miot HA, Penna G de O, Ramos AMC, Penna MLF, Schmidt SM, Luz FB, et al. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). *An Bras Dermatol*. 2018;93(6):916–28.
4. Ishiy PS, Silva LRE, Penha MÁ, Handel AC, Miot HA. Skin diseases reported by workers from UNESP campus at Rubião Jr, Botucatu-SP (Brazil). *An Bras Dermatol*. 2014;89(3):529–31.
5. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, Filho CASM, Kalil CLPV, Ayres EL, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol*. 2014;53(4):440–4.
6. Holmo NF, Ramos GB, Salomão H, Werneck RI, Mira MT, Miot LDB, et al. Complex segregation analysis of facial melasma in Brazil: evidence for a genetic susceptibility with a dominant pattern of segregation. *Arch Dermatol Res*. 2018; 310(10):827–831.
7. D'Elia MPB, Brandão MC, de Andrade Ramos BR, da Silva MG, Miot LDB, Dos Santos SEB, et al. African ancestry is associated with facial melasma in women: a cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):17.
8. Victor FC, Gelber J, Rao B. Melasma: a review. *J Cutan Med Surg*. 2004;8(2):97–102.
9. Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(2):e189–99.
10. Alcantara GP, Esposito ACC, Olivatti TOF, Yoshida MM, Miot HA. Evaluation of ex vivo melanogenic response to UVB, UVA, and visible light in facial melasma and unaffected adjacent skin. *An Bras Dermatol*. 2020;ahead of print.
11. Wiryá SA, de Castro Maymone MB, Widjajahakim R, Vashi NA. Subclinical melasma: Determining disease extent. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(2):e41–2.
12. Sonthalia S, Jha AK, Langar S. Dermoscopy of Melasma. *Indian Dermatol Online J*. 2017;8(6):525–6.
13. Zeng X, Qiu Y, Xiang W. In vivo reflectance confocal microscopy for evaluating common facial hyperpigmentation. *Skin Res Technol*. 2020;26(2):215–219.
14. Pollo CF, Miot LDB, Meneguín S, Miot HA. Factors associated with quality of life in facial melasma: a cross-sectional study. *Int J Cosmet Sci*. 2018;40(3):313–316.
15. Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT, Saltzberg F, Housman TS, Grummer S, et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol*. 2003;149(3):572–7.
16. Maranzatto CFP, Miot HA, Miot LDB, Meneguín S. Psychometric analysis and dimensional structure of the Brazilian version of melasma quality of life scale (MELASQoL-BP). *An Bras Dermatol*. 2016;91(4):422–8.
17. Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML, Azulay L, Hassun K, Almeida ART, 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.
18. Pandya AG, Hynan LS, Bhore R, Riley FC, Guevara IL, Grimes P, et al. Reliability assessment and validation of the Melasma Area and Severity Index (MASI) and a new modified MASI scoring method. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(1):78–83, 83.e1–2.
19. Pichardo R, Vallejos Q, Feldman SR, Schulz MR, Verma A, Quandt SA, et al. The prevalence

- of melasma and its association with quality of life in adult male Latino migrant workers. *Int J Dermatol*. 2009;48(1):22–6.
20. Costa A, Pereira MO, Moisés TA, Cordero T, Silva ARD, Amazonas FTP, et al. Avaliação da melhoria na qualidade de vida de portadoras de melasma após uso de combinação botânica à base de *Bellis perennis*, *Glycyrrhiza glabra* e *Phyllanthus emblica* comparado ao da hidroquinona, medido pelo MELASQoL. *Surg Cosmet Dermatol* 2011;3(3):207-12.
 21. McKesey J, Tovar-Garza A, Pandya AG. Melasma Treatment: An Evidence-Based Review. *Am J Clin Dermatol*. 2020;21(2):173-225
 22. Bala HR, Lee S, Wong C, Pandya AG, Rodrigues M. Oral Tranexamic Acid for the Treatment of Melasma: A Review. *Dermatol Surg*. 2018;44(6):814–25.
 23. Lima E de A. Microneedling in facial recalcitrant melasma: report of a series of 22 cases. *An Bras Dermatol*. 2015;90(6):919–21.
 24. Lima EVA, Lima MMDA, Paixão MP, Miot HA. Assessment of the effects of skin microneedling as adjuvant therapy for facial melasma: a pilot study. *BMC Dermatol*. 2017;17(1):14.
 25. Kwon S-H, Hwang Y-J, Lee S-K, Park K-C. Heterogeneous Pathology of Melasma and Its Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):824
 26. Brianezi G, Handel AC, Schmitt JV, Miot LDB, Miot HA. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(4):809–12.
 27. Miot LDB, Miot HA, Silva MG da, Marques MEA. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol*. 2009;84(6):623–35.
 28. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park K-C, Ortonne J-P, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1533–7.
 29. Sarkar R, Arora P, Garg VK, Sonthalia S, Gokhale N. Melasma update. *Indian Dermatol Online J*. 2014;5(4):426–35.
 30. Gautam M, Patil S, Nadkarni N, Sandhu M, Godse K, Setia M. Histopathological comparison of lesional and perilesional skin in melasma: A cross-sectional analysis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2019;85(4):367–73.
 31. Espósito AC, Brianezi G, de Souza NP, Miot LD, Miot HA. Exploratory Study of Epidermis, Basement Membrane Zone, Upper Dermis Alterations and Wnt Pathway Activation in Melasma Compared to Adjacent and Retroauricular Skin. *Ann Dermatol*. 2020;32(2):101-108.
 32. Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, Takada K, Kobayashi K, Tsunenaga M, et al. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol*. 2003;120(1):128–34.
 33. Espósito ACC, Brianezi G, de Souza NP, Santos DC, Miot LDB, Miot HA. Ultrastructural characterization of damage in the basement membrane of facial melasma. *Arch Dermatol Res*. 2020;312(3):223-227.
 34. Lee DJ, Park K-C, Ortonne JP, Kang HY. Pendulous melanocytes: a characteristic feature of melasma and how it may occur. *Br J Dermatol*. 2012;166(3):684–6.
 35. Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol*. 2000;114(2):334–42.
 36. Rajanala S, Maymone MB de C, Vashi NA. Melasma pathogenesis: a review of the latest research, pathological findings, and investigational therapies. *Dermatol Online J*. 2019; 25(10): 13030/qt47b7r28c.
 37. Kwon S-H, Na J-I, Choi J-Y, Park K-C. Melasma: Updates and perspectives. *Exp Dermatol*. 2019;28(6):704–8.
 38. Passeron T, Picardo M. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31(4):461–5.
 39. Abdel-Naser MB, Selmann H, Zouboulis CC. SZ95 sebocytes induce epidermal melanocyte dendricity and proliferation in vitro. *Exp Dermatol*. 2012;21(5):393–5.
 40. Cassiano DP, Espósito ACC, Hassun KM, Lima EV de A, Bagatin E, Miot HA. Early clinical and histological changes induced by microneedling in facial melasma: A pilot study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2019;85(6):638–41.
 41. Schaefer LV. Estudo proteômico do melasma facial em mulheres. Dissertação [mestrado em

Patologia] - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho";2019.

42. Espósito ACC, Brianezi G, de Souza NP, Miot LDB, Marques MEA, Miot HA. Exploring pathways for sustained melanogenesis in facial melasma: an immunofluorescence study. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(4):420–4.
43. Tamega A de A, Miot HA, Moço NP, Silva MG, Marques MEA, Miot LDB. Gene and protein expression of oestrogen- β and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosmet Sci.* 2015;37(2):222–8.
44. Park TJ, Kim M, Kim H, Park SY, Park K-C, Ortonne J-P, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(1):72–81.
45. Kim ES, Jo YK, Park SJ, Chang H, Shin JH, Choi ES, et al. ARP101 inhibits α -MSH-stimulated melanogenesis by regulation of autophagy in melanocytes. *FEBS Lett.* 2013;587(24):3955–60.
46. Qiang L, Wu C, Ming M, Viollet B, He Y-Y. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem.* 2013;288(3):1603–11.
47. Castanedo-Cazares JP, Hernandez-Blanco D, Carlos-Ortega B, Fuentes-Ahumada C, Torres-Álvarez B. Near-visible light and UV photoprotection in the treatment of melasma: a double-blind randomized trial. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014;30(1):35–42.
48. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hessel CL, Liu Y, Owen MR, Kollias N, et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130(8):2092–7.
49. Duteil L, Cardot-Leccia N, Queille-Roussel C, Maubert Y, Harmelin Y, Boukari F, et al. Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with UVB exposure. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(5):822–6.
50. Olinski LE, Lin EM, Oancea E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. *Adv Biol Regul.* 2020;75:100668.
51. Duteil L, Queille-Roussel C, Lacour J-P, Montaudié H, Passeron T. Short term exposure to blue light emitted by electronic devices does not worsen melasma. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(3):913-914.
52. Cho YH, Park JE, Lim DS, Lee JS. Tranexamic acid inhibits melanogenesis by activating the autophagy system in cultured melanoma cells. *J Dermatol Sci.* 2017;88(1):96-102
53. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(2):81–94.
54. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):124–31.
55. Lee H-M, Shin D-M, Yuk J-M, Shi G, Choi D-K, Lee S-H, et al. Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *J Immunol.* 2011;186(2):1248–58.
56. Murase D, Hachiya A, Takano K, Hicks R, Visscher MO, Kitahara T, et al. Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2013;133(10):2416–24.
57. Kim N-H, Choi S-H, Yi N, Lee TR, Lee A-Y. Arginase-2, a miR-1299 target, enhances pigmentation in melasma by reducing melanosome degradation via senescence-induced autophagy inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017;30(6):521–30.
58. Waldera Lupa DM, Kalfalah F, Safferling K, Boukamp P, Poschmann G, Volpi E, et al. Characterization of Skin Aging-Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2015;135(8):1954–68.
59. Kim M, Kim SM, Kwon S, Park TJ, Kang HY. Senescent fibroblasts in melasma pathophysiology. *Exp Dermatol.* 2019;28(6):719–22.
60. Kovacs D, Cardinali G, Aspite N, Cota C, Luzi F, Bellei B, et al. Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. *Br J Dermatol.* 2010;163(5):1020–7.
61. Brianezi G. Avaliação da atividade da unidade epidermo-melânica e do dano dérmico no melasma. Tese [doutorado em Patologia] - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho";2016.

Conclusões

- Receptores de OPN3 foram identificados, através de imunofluorescência de tripla marcação, em todas as células estudadas: queratinócitos, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior.
- Não houve expressão diferencial de OPN3 em nenhum grupo celular avaliado ao comparar a pele com melasma em relação à pele adjacente sã.
- Foi identificada marcação citoplasmática para p62 e LC3B nos queratinócitos suprabasais, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior.
- Não houve expressão diferencial de p62 nos diferentes tipos celulares avaliados ao comparar a pele com melasma à pele sã adjacente.
- LC3B, à imunofluorescência de tripla marcação, apresentou menor expressão nos melanócitos da camada basal da pele com melasma em comparação com a pele adjacente sã.
- Após oito dias em cultura celular, os fibroblastos da pele com melasma foram morfológicamente menos fusiformes e apresentaram menor taxa de crescimento do que os fibroblastos da pele adjacente sã. Além disso, apresentaram, em média, uma proporção 34% maior de células senescentes.
- Fibroblastos isolados da pele com melasma, em comparação com fibroblastos da pele sã adjacente, apresentam um aumento da expressão dos genes WNT3A, EDN3, ESR2, PTG2, MMP1 e SOD2; ao mesmo tempo em que apresentam uma redução na expressão dos genes COL4A1, CSF2, DKK3, COL7A1, TIMP4, CCL2 e CDH11.