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 Schimitt, 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 Marilia, 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 hipermelanogênese 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 proinflamatórios, 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;*
H_2O_2 – 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-Kβ – *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*;
TGFβ1 – *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 *software ImageJ* 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 *software ImageJ* 79
Apêndice 7. Avaliação de p62 através do *software ImageJ* 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 centrofaciais (máculas na glabela, 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)

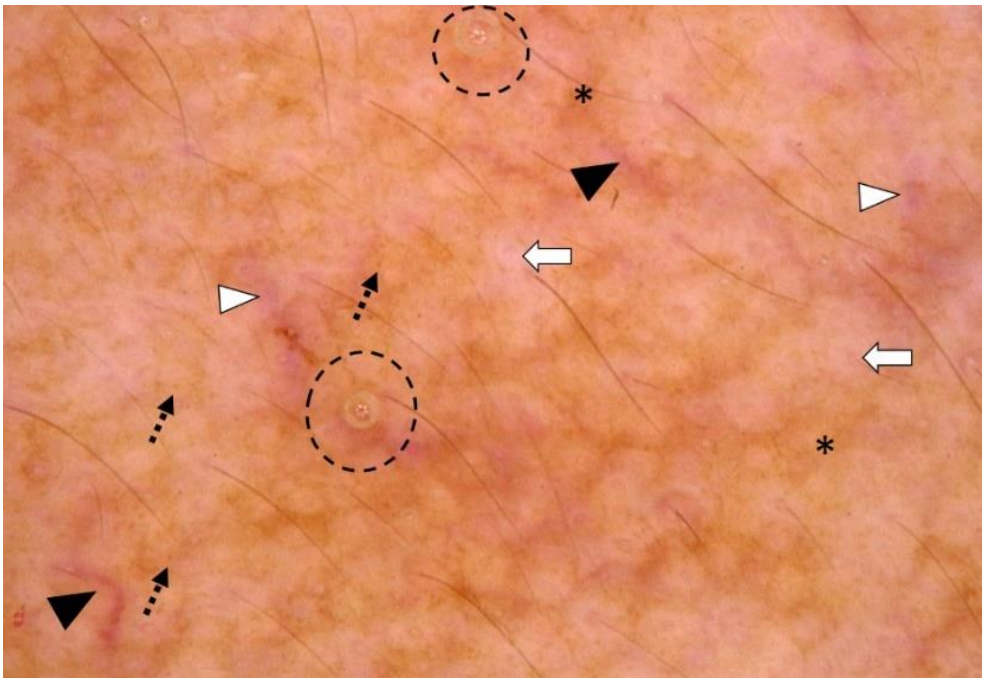


Figura 2 – Dermatoscopia do melasma. Presença de pseudorrede pigmentar difusa marrom (asterisco), áreas vermelhas homogêneas (triângulo branco), telangiectasias (triângulo preto), hipopigmentação perifolicular (seta branca), pontos marrons (seta preta tracejada), *plug*s foliculares (circunferência tracejada).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

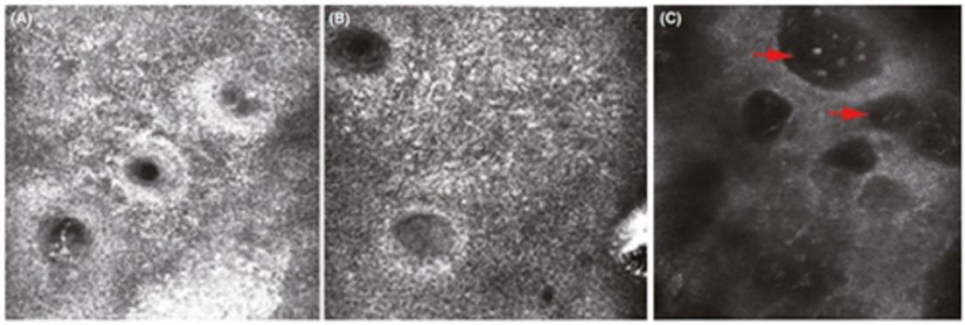


Figura 3 – Pele com melasma à microscopia confocal. Há, na epiderme, um incremento no padrão *cobblestone* (A), além de ramificações arquiteturais relacionadas aos denditros de melanócitos (B). Na derme superior, há melanófagos (C – setas vermelhas).(13)

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 acetonida 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)

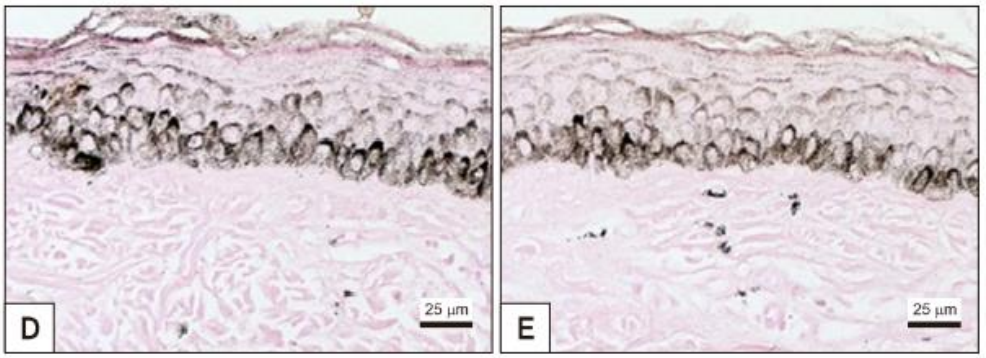


Figura 4 – Maior concentração de pigmento melânico na epiderme do melasma (D) do que na pele adjacente sã (E) - Fontana-Masson.(31)

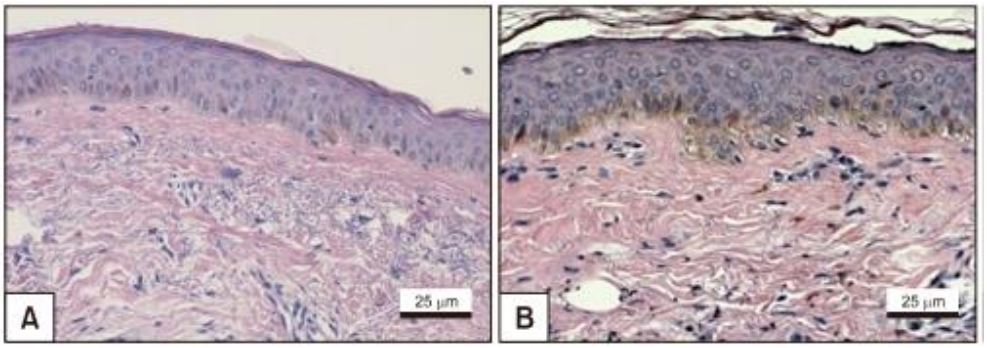


Figura 5 – Camada córnea do melasma (A) com evidente compactação, em relação à pele sã adjacente (B) - Hematoxilina-Eosina.(31)

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)

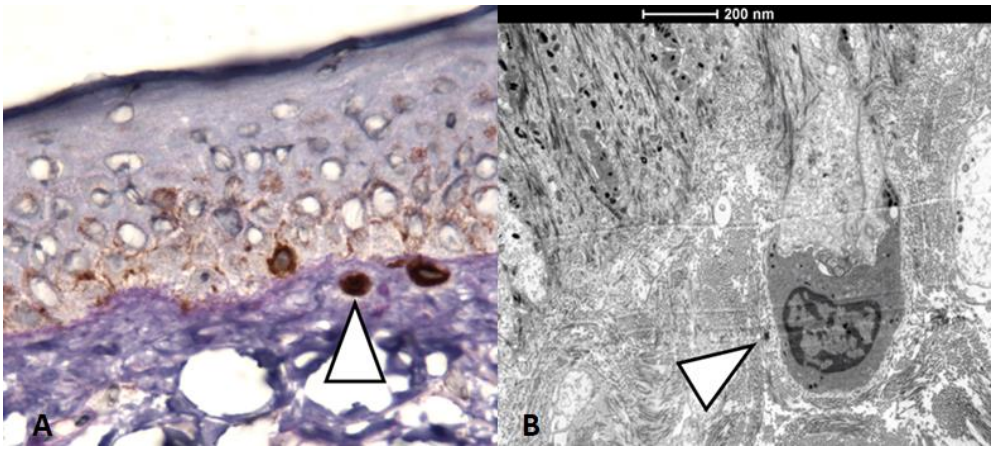


Figura 6 – **A**. Seta branca apontando um melanócito em pêndulo na pele com melasma (Ácido Periódico de Schiff). **B**. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando um melanócito da camada basal se projetando em direção à derme (melanócito em pêndulo) – seta branca.(33)

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)

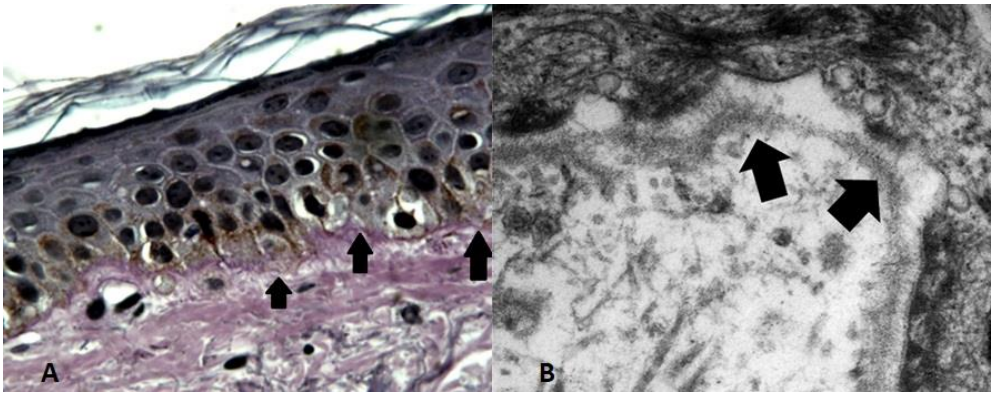


Figura 7 – **A**. Ruptura e fragmentação da ZMB – setas pretas (Ácido Periódico de Schiff). **B**. À microscopia eletrônica de transmissão, a área entre as setas pretas apresenta um afinamento da *lamina densa* e perda de fibrilas de ancoragem da *lamina lucida*.(33)

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)

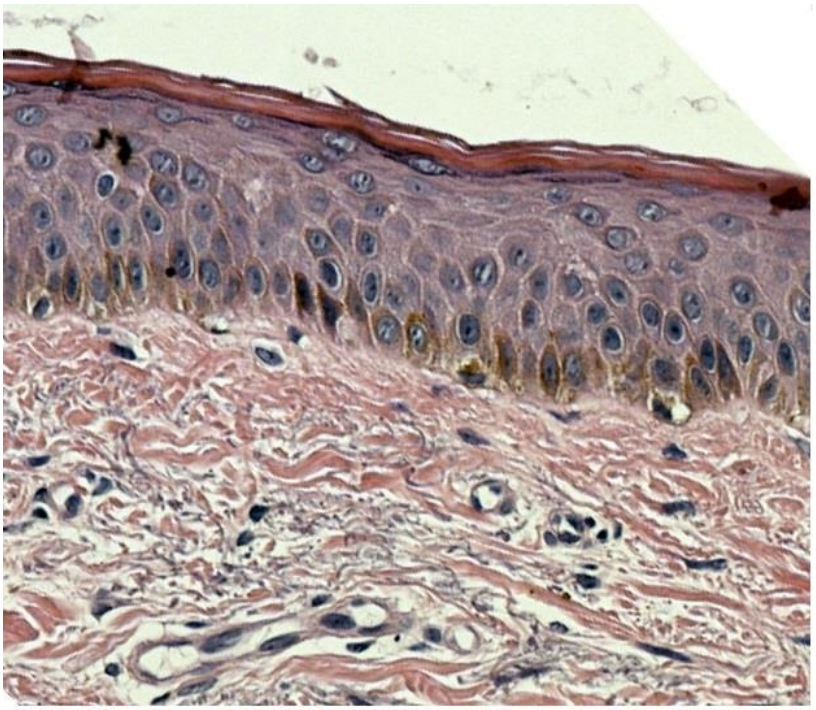


Figura 8 – Elastose solar acentuada na derme superior do melasma (Hematoxilina-Eosina, 400x). Arquivo dos pesquisadores.

Diversos agentes, como o fator de crescimento de fibroblasto, interleucina-8, endotelina-1, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth fator*) 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)

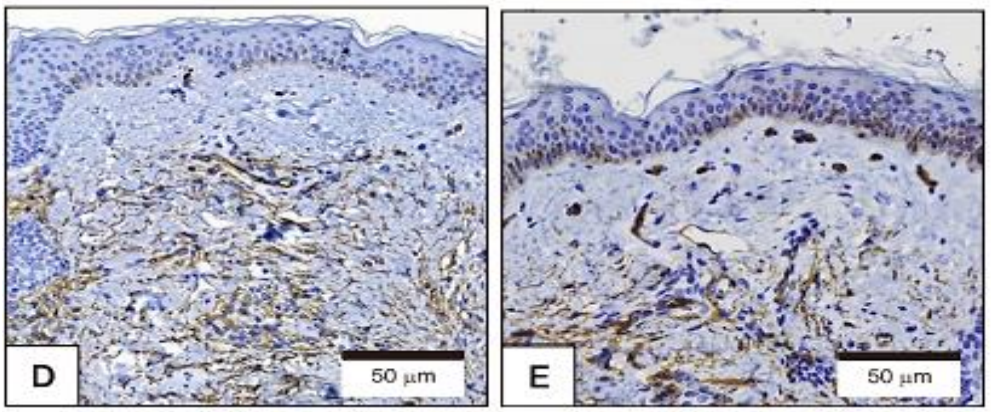


Figura 9 – Marcação por CD38 evidenciando o componente vascular mais exuberante na pele com melasma (D) do que na pele sã adjacente (E).(31)

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 1α, 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)

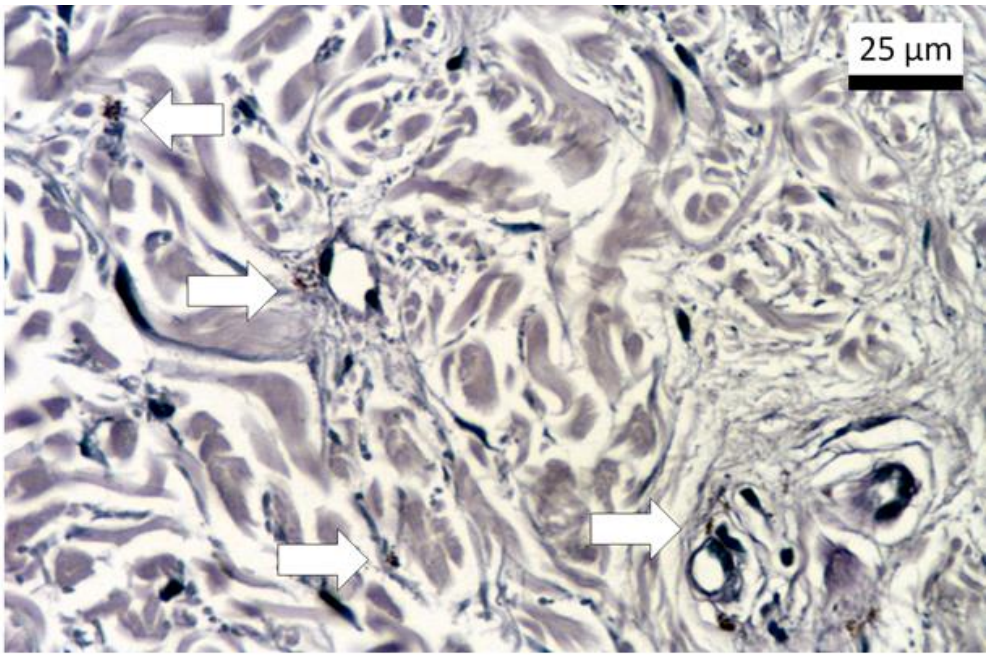


Figura 10 - Mastócitos (setas brancas) de distribuição perivascular no melasma.(30)

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, enzina-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)

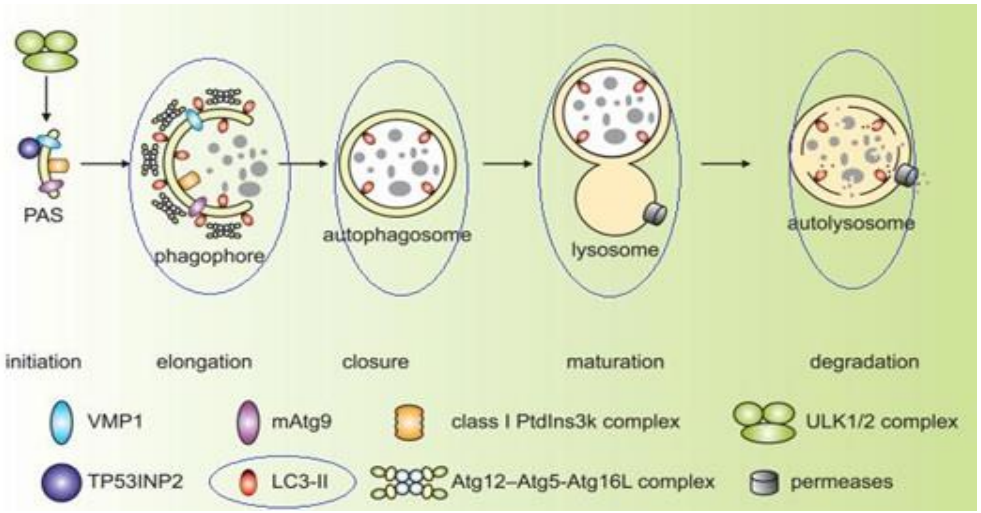


Figura 11 – Durante a autofagia, há formação de vesículas sequenciais para degradação do conteúdo intracelular disfuncional. A proteína LC3 se mantém, durante todo o processo, ligada à membrana das vesículas.(54)

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 sã 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 sã 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. Wirya 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, Meneguin 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, Meneguin S. Psychometrican 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, Seltmann 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, Hexsel 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.

Objetivos

1. Avaliar a expressão (presença de marcação) do receptor de luz visível OPN3 nos queratinócitos, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior na pele com melasma facial de mulheres e na pele adjacente sã.
2. Avaliar a expressão de OPN3 nas células de interesse (queratinócitos, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior) na pele com melasma facial de mulheres em comparação com a pele adjacente sã.
3. Avaliar a expressão de marcadores de autofagia (LC3B e p62) nos queratinócitos, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior na pele com melasma facial de mulheres e na pele adjacente sã.
4. Avaliar a expressão de LC3B e p62 nas células de interesse da pele com melasma facial de mulheres em comparação à pele adjacente sã.
5. Avaliar a taxa de crescimento, morfologia e perfil de senescência dos fibroblastos (cultura primária) da pele com melasma em comparação com os da pele adjacente sã.
6. Avaliar a expressão gênica nos fibroblastos da pele com melasma em comparação com os da pele adjacente sã.

Primeiro Manuscrito - Anais Brasileiros de Dermatologia

Ahead of print

Título: Expressão de OPN3 em fibroblastos, melanócitos e queratinócitos da pele com melasma facial em comparação com a pele adjacente não afetada.

Title: *OPN3 expression in fibroblasts, melanocytes and keratinocytes of skin with melasma facial compared to adjacent unaffected skin.*

Formato: Research Letter

Autores:

Ana Cláudia Cavalcante Espósito, MD, MSc (1)
anaclaudiaesposito@gmail.com
ORCID: 0000-0001-9283-2354
Abreviatura: Espósito, ACC

Nathália Pereira de Souza, Msc (2)
ORCID: 0000-0001-6052-0356
nathalips@gmail.com

Luciane Donida Bartoli Miot, PhD (1)
ORCID: 0000-0002-2388-7842
lucianemiot@fmb.unesp.br
Dermatologista do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu, SP, Brasil.
Miot, L.D.B.

Hélio Amante Miot, PhD, Livre-docente (1)
ORCID: 0000-0002-2596-9294

heliomiot@gmail.com
Professor associado do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu, SP, Brasil.
Miot, H.A.

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

Local onde o trabalho foi realizado:

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

Endereço de correspondência:

Ana Cláudia Cavalcante Espósito
Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, SP, Brasil.
CEP 18618-000
Email: anaclaudiaesposito@gmail.com

Conflito de interesses: Nenhum;

Financiamento: FUNADERSP – Fundo de apoio à dermatologia de São Paulo – SEBASTIÃO SAMPAIO.

Resumo: Não se aplica

Palavras-chave: Melasma, Raios Ultravioleta, Luz

Senhor Editor.

Melasma é uma discromia crônica adquirida frequente que acomete áreas fotoexpostas especialmente em mulheres em idade fértil. A radiação ultravioleta (RUV) é o principal estímulo ambiental na indução da pigmentação do melasma; entretanto, o papel da luz visível (LV: 400-700 nm) em sua patogênese, ainda é incerto. LV compreende cerca de 44% da irradiação solar e promove pigmentação mais duradoura (>2 semanas) que o UVA; contudo, apenas em fototipos mais elevados (IV a VI).[1]

Opsina-3, encefalopsina ou panopsina (OPN3) é um fotorreceptor acoplado à proteína G, que promove melanogênese induzida pela luz azul (420-490 nm). Na retina, foram descritas opsinas 1 a 5, porém, OPN3 é a forma mais expressa na pele, que induz a fosforilação do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) nos melanócitos, resultando na ativação da tirosinase.[2] Até o momento, não foi investigada a expressão diferencial de OPN3 na pele com melasma em comparação com a pele adjacente e, caso a luz visível participe do desencadeamento do melasma, seria esperado uma maior expressão deste receptor na pele acometida, especialmente nos queratinócitos e melanócitos.

Neste estudo, após aprovação no Comitê de Ética (**apêndice 1** e **anexo 1**), 20 mulheres com melasma facial (diagnosticado clinicamente por dermatologista experiente), sem tratamento há mais de 30 dias (exceto filtro solar) foram submetidas a duas biópsias (3 mm): pele com melasma e pele adjacente clinicamente não afetada (com distância máxima de 2 cm do limite da lesão).

Os 40 espécimes foram submetidos à imunofluorescência de tripla marcação pelos os anticorpos primários e diluições padronizadas: anti-OPN3 *rabbit* (ab228748-Abcam, Cambridge-MA, EUA) 1:150; anti-vimentina *mouse* (ab8978-Abcam, Cambridge-MA, EUA) 1:100, que se expressa em melanócitos e nos filamentos intermediários dos fibroblastos; e pelo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), para marcação dos núcleos celulares. Os anticorpos secundários (cromóforos) e diluições para o OPN3: AlexaFluor 594 - 1:500 (vermelho); e, para a vimentina: AlexaFluor 488 - 1:500 (verde). Todas as reações foram testadas para seus controles positivos e negativos (protocolo completo da imunofluorescência e controles disponíveis no

anexo 2.

Três áreas de maior imunomarcação das lâminas de cada topografia (melasma e pele não afetada) foram fotografadas por microscopia confocal a laser LEICA TCS-SP8. Utilizando o canal do laser vermelho (cromóforo do OPN3), orientado pela colocalização de pontos verdes citoplasmáticos, e fora da colocalização azul nuclear, as intensidades médias dos histogramas de imagem (variação de 0 a 255) foram estimadas através do *software* ImageJ, para os diferentes tipos celulares, de forma cega em relação à topografia (**apêndice 3**). A intensidade média de fluorescência em cada grupo celular foi comparada entre as topografias pelo teste t de *Student* (dados dependentes). Foram também estimadas as contagens celulares entre as topografias. Considerou-se significativo $p<0,05$, bicaudal.

Receptores de OPN3 foram identificados em todas as células estudadas: queratinócitos, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior (**figura 1**). Não houve expressão diferencial em nenhum grupo celular, ao se comparar a pele com melasma em relação à pele adjacente sã (**tabela 1**).

Não houve diferença da contagem de melanócitos e fibroblastos na derme superior por campo de grande aumento (400x) entre as duas topografias. Entretanto, a pele com melasma apresentou maior densidade de melanócitos em pêndulo (**tabela 2**).

Os resultados deste estudo sugerem que a expressão de OPN3 não justifica a diferença de pigmentação cutânea no melasma, em relação à pele adjacente não afetada. Caso a LV apresente um papel importante na sua patogênese, ela não o exerce em função da expressão de OPN3. De fato, pacientes com melasma facial não apresentaram piora das lesões após exposição à tela de computador (8h/dia, 5 dias consecutivos), a uma distância de 20 cm.[3] Além disso, a expressão das opsinas (OPN1 a 5) na pele, sabidamente não apresenta diferença de acordo com os fototipos.[2]

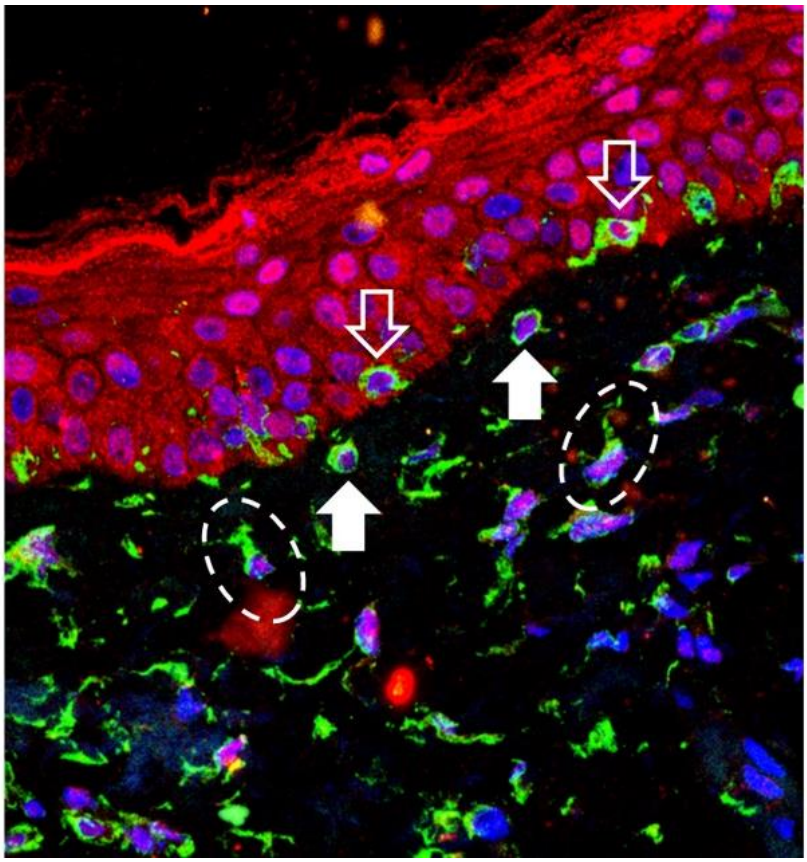


Figura 1. Imagem de sobreposição da imunofluorescência de tripla marcação (400x) em pele com melasma. Marcação em verde (vimentina), vermelho (Opsina-3), azul (núcleos celulares). Seta com contorno branco: melanócitos na camada basal. Seta branca cheia: melanócitos em pêndulo. Elipses tracejadas: fibroblastos da derme superior.

Tabela 1. Avaliação da média (desvio-padrão) da intensidade de pixels (canal vermelho) correspondentes à expressão de OPN3 nas 20 participantes, de acordo com a topografia e os tipos celulares avaliados.

	Melasma	**Pele não afetada**	**p-valor***
Epiderme suprabasal	30,4 (10,3)	33,9 (9,3)	0,170
Melanócitos da camada basal	23,3 (9,6)	26,0 (7,9)	0,364
Melanócitos em pêndulo	23,7 (11,8)	22,3 (8,8)	0,652
Fibroblastos da derme superior	16,6 (10,2)	17,3 (6,7)	0,763

* comparação bivariada entre as topografias

Tabela 2 – Contagem média (desvio-padrão) de células (melanócitos, melanócitos em pêndulo e fibroblastos) por campo de grande aumento (400x).

	Melasma	Pele não afetada	p-valor*
Melanócitos da camada basal	3,2 (1,3)	3,6 (1,5)	0,451
Melanócitos em pêndulo	2,3 (0,9)	1,8 (0,7)	**0,031**
Fibroblastos da derme superior	4,5 (2,0)	4,4 (1,4)	0,915

Há um efeito sinérgico entre a LV e RUV do tipo A1 (UVA1: 340-400 nm). Quando indivíduos de fototipo IV a V são irradiados com LV isolada, a pigmentação ocorre de forma não linear com a dose irradiada. Já quando UVA1 é associada à LV, há pigmentação mais intensa e a resposta é diretamente proporcional à dose utilizada.[4] O sinergismo da LV com UVA1 na pigmentação diferencial do melasma necessita ser explorado com desenhos experimentais específicos.

A ocorrência de OPN3 em tecidos humanos fora da retina é chamada expressão "não visual", cujas funções não são totalmente esclarecidas. Na pele, além da modulação da melanogênese, promove diferenciação de queratinócitos e ativação de metaloproteinases (MMP 1, 2, 3 e 9) pelos fibroblastos.[2,5] OPN3 também pode ser induzida na pele após irradiação por luz azul em modelos de reparo cicatricial, sugerindo que exerça papel na cicatrização cutânea.[6]

Melanócitos em pêndulo são melanócitos da camada basal que se projetam em direção à derme superior e são característicos da pele com melasma, apesar de serem encontradas em menor proporção, na pele fotoagredida adjacente.[7] Seu significado fisiopatológico não é claro, mas sua ocorrência parece estar relacionada ao aumento de metaloproteinase 2 e fragmentação da membrana basal. Seu maior número na pele com melasma reforça o papel da RUV na fisiopatologia da doença, já que UVA promove um microambiente inflamatório na derme superior, com aumento da atividade das metaloproteinases (especialmente MMP 2 e 9) e degradação da membrana basal, o que facilita a protusão dos melanócitos em direção à derme.[8,9]

Este estudo apresenta limitações ligadas à técnica de investigação semiquantitativa *in situ*, que não identifica diferentes isoformas (*splicing*) dos fotorreceptores ou detecta alterações funcionais da sua via. Existem outras células fusiformes na derme superior além dos fibroblastos (p.ex. células dendríticas

indiferenciadas mesenquimais CD4+) que, apesar de menos numerosas, não são distinguíveis à morfologia, nem à marcação pela vimentina. Ainda, as demais opsinas (OPN 1, 2, 4 e 5) não foram exploradas, apesar de menos expressas na pele normal.

Em conclusão, não há expressão diferencial de OPN3 nos queratinócitos, melanócitos ou fibroblastos no melasma facial em comparação com a pele adjacente não afetada.

Referências

1. Narla S, Kohli I, Hamzavi IH, Lim HW. Visible light in photodermatology. Photochem Photobiol Sci. 2020; 19(1):99-104.
2. Olinski LE, Lin EM, Oancea E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. Adv Biol Regul. 2020;75:100668.
3. Duteil L, Queille-Roussel C, Lacour JP, 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.
4. Kohli I, Chaowattanapanit S, Mohammad TF, Nicholson CL, Fatima S, Jacobsen G, et al. Synergistic effects of long-wavelength ultraviolet A1 and visible light on pigmentation and erythema. Br J Dermatol. 2018; 178(5):1173–80.
5. Lan Y, Wang Y, Lu H. Opsin 3 is a key regulator of ultraviolet A-induced photoageing in human dermal fibroblast cells. Br J Dermatol. 2020; 182(5): 1228–1244.
6. Castellano-Pellicena I, Uzunbajakava NE, Mignon C, Raafs B, Botchkarev VA, Thornton MJ. Does blue light restore human epidermal barrier function via activation of Opsin during cutaneous wound healing?. Lasers Surg Med. 2019; 51(4):370–382.
7. Esposito 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.
8. Esposito ACC, Brianezi G, de Souza NP, Miot LDB, 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.
9. Esposito 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):420–424.

Segundo Manuscrito – artigo em avaliação no *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*

Título: Déficit na autofagia: um possível mecanismo envolvido na hiperfunção melanocítica no melasma

Autores:

Ana Cláudia Cavalcante Espósito, MD, Msc (1)
anaclaudiaesposito@gmail.com

Nathália Pereira de Souza, Msc (2)
nathalips@gmail.com

Luciane Donida Bartoli Miot, PhD (1)
lucianemiot@fmb.unesp.br

Hélio Amante Miot, PhD, Livre-docente (1)
heliomiot@fmb.unesp.br

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

Local onde o trabalho foi realizado:

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

Endereço de correspondência:

Prof. Hélio Amante Miot.

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

Fone/FAX: +55 14 38824922

Email: heliomiot@fmb.unesp.br

Conflito de interesses: Nenhum;

Financiamento: FUNADERSP – Fundo de apoio à dermatologia de São Paulo – SEBASTIÃO SAMPAIO.

Palavras-chave: Melanose, Autofagia, Senescência Celular, Raios Ultravioleta

Introdução

Autofagia é uma via catabólica celular que tem por finalidade eliminar agregados proteicos poliubiquitinados e organelas danificadas ou envelhecidas.(1) Também pode ser entendida como um mecanismo de defesa ao estresse ambiental, como restrição de nutrientes, hipóxia, estresse oxidativo e radiação.(1-3) A exposição à radiação ultravioleta (RUV), especialmente do tipo A, induz a formação de espécies reativas de oxigênio e promove a oxidação de membranas lipídicas. Através da autofagia, os aglomerados de proteínas fosfolipídicas oxidadas são degradados para que não ocorra dano celular decorrente do acúmulo intracelular.(4)

Durante a autofagia, as estruturas a serem eliminadas são sequestradas por uma vesícula de dupla membrana (autofagossomo), que se funde ao lisossomo e/ou endossomo, formando um autolisossomo. A exposição às hidrolases faz a digestão celular e as macromoléculas resultantes são transportadas de volta ao citosol, a fim de serem reutilizadas.(1,5)

LC3 é uma proteína semelhante à ubiquitina que, ao ser clivada, gera a proteína citosólica LC3-I.(66) Ao se conjugar à fosfatidiletanolamina, LC3-I origina LC3-II, que se liga a ambas as faces da dupla membrana do autofagossomo. Quando ocorre a fusão com o lisossomo/endossomo, LC3-II é removida da porção externa da membrana.(6)

A proteína de ligação p62/SQSTM1 reconhece os agregados proteicos poliubiquitinados e os liga à maquinaria autofágica, podendo ser através da interação com LC3.(6) Durante o processo de autofagia, p62 é destruída, entretanto, quando a autofagia está inibida ou deficiente, habitualmente há um aumento no tamanho e na quantidade de p62.(3,7-9) Há uma interação preferencial de p62 com LC3 durante a autofagia, mas esta não é uma via exclusiva ou única.(10)

Certos tipos de câncer, doenças neurodegenerativas e infecções estão relacionados à autofagia.(3) Por participar da degradação dos melanossomas danificados, este processo também influencia na pigmentação da pele.(11) Culturas *ex vivo* de pele humana apresentam aumento dos níveis de melanina quando tratadas com agentes inibidores da autofagia.(11) Além disso, os queratinócitos de

caucasianos apresentam uma maior atividade autofágica do que dos afroamericanos, o que acarreta maior degradação da melanina e fenótipo menos pigmentado.(11) Já os indivíduos com esclerose tuberosa apresentam aumento da autofagia nos melanócitos das lesões hipopigmentadas, com expressão aumentada de LC3 e redução de p62.(12)

Melasma é uma hipermelanogênese focal crônica que acomete principalmente mulheres entre a segunda e quarta décadas de vida.(13) É mais comum nos indivíduos de fototipo III a V de Fitzpatrick e, em populações com altas taxas de miscigenação, sendo associado à ancestralidade africana.(14) Dentre os fatores relacionados ao desencadeamento da doença, a RUV é certamente o ponto chave.(15) A fisiopatologia da doença é complexa e ainda não compreendida em sua totalidade. Os melanócitos estão hipertrofiados e hiperfuncionantes; há aumento no número de melanócitos em pêndulo (melanócitos da camada basal que se projetam em direção à derme) e maior número de áreas com dano estrutural na zona da membrana basal (ZMB).(16) A derme superior apresenta incremento na quantidade de vasos e de mastócitos, em meio a um microambiente inflamatório com elastose solar pronunciada e fibroblastos com alteração no perfil de secreção (fenótipo senescente).(16) A presença de células disfuncionais na derme superior e a retenção epidérmica de melanossomas maduros sugerem que alterações na autofagia e senescência celular podem sustentar a manutenção da pigmentação no melasma.(17) No melasma, há um aumento na expressão de arginase-2 nos queratinócitos – um inibidor da autofagia -, entretanto ainda não se conhece o comportamento diferencial da autofagia nos diferentes tipos celulares e nem mesmo comparativamente à pele adjacente.(18)

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de marcadores de autofagia nos melanócitos, melanócitos em pêndulo, queratinócitos e fibroblastos da derme superior da pele com melasma facial de mulheres, comparativamente à pele sã adjacente. A hipótese prévia ao estudo é que haveria uma redução na autofagia na pele com melasma, com possível redução na expressão de LC3 e aumento de p62 nos melanócitos, queratinócitos e fibroblastos da derme superior.

Métodos

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (parecer 2.700.672 – **apêndice 1** e **anexo 1**). Foram incluídas 20 mulheres adultas (>18 anos) com melasma facial, sem tratamento há mais de 30 dias, exceto pelo uso do filtro solar, selecionadas entre os casos novos do ambulatório de dermatologia da FMB-Unesp (Botucatu-SP, Brasil), no período de junho a dezembro de 2018. Não foram incluídas pacientes com doenças sistêmicas, gestantes ou sob anticoagulação.

Cada participante da pesquisa foi submetido à retirada de dois fragmentos de pele (*punch* 3 mm): um da pele com melasma facial e outro da pele sã adjacente (até 2 cm do limite da lesão de melasma).

Os fragmentos obtidos foram fixados em formalina 10% tamponada e emblocados em parafina. Foi realizada imunofluorescência direta de tripla marcação para as proteínas LC3B, vimentina e DAPI (**apêndice 4**), além de p62, vimentina e DAPI (**apêndice 5**). A escolha de LC3B residiu em sua capacidade de identificar tanto as bandas de LC3-I quanto LC3-II.(54) Já a vimentina é um filamento intermediário (10 nm de diâmetro) de 52-58 Kd, expressa em melanócitos benignos e malignos, além de ser o principal filamento intermediário dos fibroblastos.(19,20) As padronizações dos protocolos de imunofluorescência dependeram da titulação da menor concentração de anticorpos capazes de serem detectadas nas lâminas de controles positivos.

Para a imunofluorescência tripla LC3B, vimentina e DAPI, o protocolo envolveu anticorpo *rabbit* anti-LC3B (ab51520, Abcam, Cambridge - MA, EUA) a 1:250 e mantido em incubação *overnight* (por 12 horas) em câmara úmida a 4ºC, tratamento com anticorpo *mouse* anti-vimentina (ab8978 Abcam, Cambridge - MA, EUA) a 1:100 mantido por 120 minutos e DAPI foi utilizado para a marcação nuclear (D1306, Thermo Fisher Scientific, Waltham - MA, USA). Já para a tripla marcação p62, vimentina e DAPI, diferiu ao utilizar *rabbit* anti-SQSTM1/p62 (ab91526, Abcam, Cambridge - MA, EUA) 1:50 *overnight* (12 horas), sendo os demais marcadores iguais ao protocolo anterior.

As áreas de maior marcação das lâminas de ambos os protocolos foram fotografadas em equipamento de microscopia confocal LEICA TCS SP8, dotado de *laser* com emissão em 405, 488, 552 e 638 nm e dois detectores do tipo fotomultiplicadores, além de um do tipo híbrido, o que possibilita a aquisição simultânea de inúmeros canais de fluorescência.

As imagens tipo *TIFF com 813x813 pixels foram salvas para cada canal de marcador. Foi realizada análise quantitativa cega em relação à topografia (pele com melasma ou pele sã adjacente) para p62 e LC3B nos queratinócitos suprabasais, melanócitos da camada basal, melanócitos em pêndulo e fibroblastos da derme superior. A variável dependente do estudo foi a intensidade média do histograma de cor do canal "*red*" (0 a 255) nos citoplasmas das células-alvo, as medidas foram corrigidas pela luminosidade de fundo de cada foto. A identificação dos melanócitos e dos fibroblastos foi possível graças à marcação com vimentina em ambos os protocolos: células dendríticas próximas à base da epiderme e células estreladas/fusiformes da derme superior. O *software* utilizado para a análise quantitativa foi o ImageJ 1.51j8 (**apêndice 6 e 7**).

A normalidade dos dados obtidos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.(21) Os dados foram comparados entre as topografias utilizando modelo linear generalizado de efeitos mistos, com estrutura de covariância robusta, distribuição de probabilidade ajustada a cada amostra (normal ou gama) e análise *post-hoc* pelo algoritmo de Sidak sequencial.(22,23)

A análise foi realizada no software IBM SPSS 22, e a significância definida para $p \leq 0,05$.

O dimensionamento amostral foi baseado na expectativa de diferença entre as topografias de mais de 10% das expressões entre as peles amostradas, com alfa 0,05 e beta 0,2.(24)

Resultados

Dentre as 20 participantes, a idade média foi de 35 anos e 18 delas faziam uso regular de filtro solar (**tabela 1**). As intensidades de fluorescência de LC3B e P62

em cada grupo celular estão reunidos na **tabela 2**. 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 ao compararmos a pele com melasma com a pele sã adjacente. Já LC3B apresentou menor expressão nos melanócitos da camada basal do melasma (**figura 1**).

Tabela 1. Distribuição etária, por fototipo e caracterização dos antecedentes pessoais e familiares das 20 participantes.

		Participantes
N		20
Idade (anos)		35 (28-44)
Fototipo		
	I	0
	II	4
	III	10
	IV	5
	V	1
	VI	0
Antecedente familiar de melasma		18
Idade da menarca (anos)		12 (11-13)
Uso de filtro solar		18
Fotoexposição diária		16
Uso de contraceptivo oral		15

Tabela 2. Média (desvio-padrão) da intensidade de fluorescência (*pixels*) nos principais grupos celulares na pele com melasma e na pele adjacente sã (n=20). IC: intervalo de confiança.

	Melasma	**Controle**	**IC da diferença (95%)**	**p-valor***
LC3B				
Queratinócitos suprabasais	24,6 (9,9)	26,3 (8,7)	-6,0 a 2,49	0,381
Melanócitos	33,6 (10,0)	38,0 (10,7)	-11,7 a -1,2	**0,025**
Melanócitos em pêndulo	35,1 (9,0)	37,6 (14,6)	-8,8 a 3,8	0,390
Fibroblastos derme superior	35,8 (10,5)	38,5 (11,6)	-8,4 a 2,9	0,304
p62				
Queratinócitos suprabasais	21,6 (10,3)	21,8 (10,1)	-5,4 a 5,8	0,941
Melanócitos	27,1 (9,2)	28,0 (8,6)	-3,0 a 5,8	0,528
Melanócitos em pêndulo	26,4 (11,1)	25,2 (10,3)	-4,7 a 6,5	0,743
Fibroblastos derme superior	19,8 (5,6)	20,2 (7,9)	-3,6 a 2,5	0,718

**Post hoc* para múltiplas comparações: Sidak sequencial.

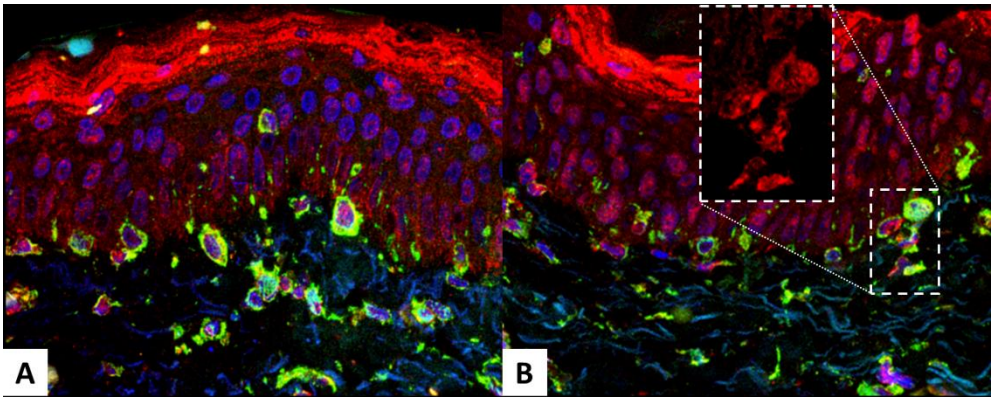


Figura 1. Sobreposição de imagens da imunofluorescência direta (400x) evidenciando melanócitos e fibroblastos na pele com melasma (A) e na pele adjacente não acometida (B). Detalhe: marcação citoplasmática nos melanócitos e fibroblastos. LC3B – Vermelho; Vimentina – verde; DAPI – azul.

Discussão

Foi evidenciado que na pele com melasma há um comprometimento da autofagia nos melanócitos da camada basal, via LC3B; entretanto o decréscimo autofágico não tem participação de p62. Sabe-se que a funcionalidade das células é mantida pelo balanço entre o estresse oxidativo e a autofagia.(25) A RUV, especialmente a UVA-1, promove um ambiente inflamatório, com aumento de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, o que facilita a formação e acúmulo de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos danificados irreversivelmente.(17,26,27) Como resposta fisiológica ao ambiente inflamatório, espera-se que o organismo estimule a autofagia, com ativação da resposta antioxidante ligada a NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), a fim de eliminar as macromoléculas citosólicas alteradas.(27)

Na última década, têm crescido a compreensão e a investigação sobre alterações na autofagia que influenciam o desencadeamento e manutenção de doenças, inclusive dermatológicas, já que déficits neste processo levam ao acúmulo de organelas com fenótipo de senescência, agregados proteicos disfuncionais e manutenção do estresse oxidativo.(28) Na psoríase, por exemplo, há evidências de déficit da autofagia (via aumento de p62) na epiderme acometida.(29)

Nas doenças pigmentares, tanto as doenças com diminuição quanto aumento da pigmentação, apresentam participação das vias de autofagia. No vitiligo, os melanócitos apresentam uma desregulação neste processo e hipersensibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2).(25,30)

Nas pacientes com melasma, em que há maior prevalência de ancestralidade africana, as áreas pré-determinadas geneticamente por mosaicismo para desenvolvimento das manchas apresentam um comprometimento da autofagia nos melanócitos da camada basal, via participação de LC3B.(14) O bloqueio na autofagia promove acúmulo de macromoléculas disfuncionais e nocivas, além de lipídios oxidados.(25,31)

O déficit de autofagia dos melanócitos da camada basal altera o perfil de citocinas para um fenótipo secretor pró-inflamatório.(32) Há aumento de quimiocinas CXC ligantes (Cxcl) do tipo 1, 2, 10 e 12, que participam da fisiopatologia de doenças pigmentares, além de aumento da expressão de metaloproteinases (MMP), especialmente 3 e 13.(32) As MMPs são capazes de degradar o colágeno e promover fragmentação da ZMB.(33) No melasma, o dano estrutural à ZMB facilita o tráfego de citocinas da derme aos melanócitos, o que promove aumento da síntese de melanina, além das rupturas favorecerem a projeção dos melanócitos da basal em direção à derme (melanócitos em pêndulo).(16)

O ácido tranexâmico (AT) é uma droga eficaz na redução da pigmentação melânica do melasma.(34) Estudos experimentais sugerem que, além de reduzir diretamente a síntese de tirosinase no melanócito, o AT é capaz de estimular vias de autofagia, ao aumentar a síntese de MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*), *kinase* reguladora de sinal extracelular 1/2, Beclin-1, proteína 12 relacionada à autofagia e LC3 I-II, além de reduzir a síntese do complexo mTOR (via da rapamicina).(35)

Os fibroblastos dérmicos regulam a função secretora dos melanócitos através da síntese de *stem cell factor* (SCF), *keratinocyte growth factor* (KGF*), hepatocyte growth factor* (HGF) e *basic fibroblast growth factor* (bFGF).(36) Quando expostos à RUV, os fibroblastos aumentam a secreção de SCF proporcionalmente à irradiação recebida.(36). A exposição à RUV em uma área com susceptibilidade genética pré-

determinada ao desenvolvimento das manchas propicia um fenótipo senescente precoce nos fibroblastos, que passam a secretar mais SCF do que fibroblastos jovens, o que contribui para o incremento à síntese melânica.(36,37) Fibroblastos senescentes, quando co-cultivados com melanócitos, induzem maior síntese de melanina e atividade da tirosinase do que co-cultura melanócitos-fibroblastos jovens.(38)

O *stromal derived factor-1* (SDF1) tem ação anti-melanogênica ao promover *downregulation* da sinalização de AMP cíclico, MITF e tirosinase aos melanócitos. Quando os fibroblastos são senescente, há uma inibição de cunho epigenético à síntese de SDF1, o que incrementa a pigmentação melânica.(38) Estratégias terapêuticas focadas na remodelação da derme superior, como o microagulhamento, são promissoras, justamente por aumentar a deposição de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos.(34,39)

Apesar do comprometimento da autofagia mediada por LC3B nos melanócitos, não houve expressão diferencial de p62 nas células estudadas, sugerindo que, no melasma, há um comprometimento da autofagia não dependente de p62. Essa independência de vias já foi previamente descrita no carcinoma espinocelular pulmonar, em que há comprometimento da autofagia exclusivamente via p62, sem alteração em LC3B.(40,41)

Este estudo apresenta limitações ligadas à técnica de investigação semiquantitativa e, apesar de terem sido investigados dois postos-chave da autofagia, não abrangeu a totalidade das proteínas envolvidas na via.

Conclusão

A pele com melasma apresenta uma redução na expressão de LC3B nos melanócitos da camada basal em comparação com a pele adjacente sem lesão, indicando um comprometimento na via autofágica, o que propicia acúmulo de organelas senescentes, agregados proteicos disfuncionais e manutenção do estresse oxidativo.

Referências

1. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. Curr Opin Cell Biol. 2010;22(2):124–31.
2. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature. 2008;451(7182):1069–75.
3. Bresciani A, Spiezia MC, Boggio R, Cariulo C, Nordheim A, Altobelli R, et al. Quantifying autophagy using novel LC3B and p62 TR-FRET assays. PLoS ONE. 2018;13(3):e0194423.
4. Wang M, Charareh P, Lei X, Zhong JL. Autophagy: Multiple Mechanisms to Protect Skin from Ultraviolet Radiation-Driven Photoaging. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:8135985.
5. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell. 2010;140(3):313–26.
6. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. Curr Top Microbiol Immunol. 2009;335:1–32.
7. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. J Cell Biol. 2005;171(4):603–14.
8. 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.
9. Loos F, Xie W, Sica V, Bravo-San Pedro JM, Souquère S, Pierron G, et al. Artificial tethering of LC3 or p62 to organelles is not sufficient to trigger autophagy. Cell Death Dis. 2019;10(10):771.
10. Maruyama Y, Sou Y-S, Kageyama S, Takahashi T, Ueno T, Tanaka K, et al. LC3B is indispensable for selective autophagy of p62 but not basal autophagy. Biochem Biophys Res Commun. 2014;446(1):309–15.
11. 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.
12. Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Hasegawa J, Yoshimori T, Tanemura A, et al. Dysregulation of autophagy in melanocytes contributes to hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex. J Dermatol Sci. 2018;89(2):155–64.
13. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. An Bras Dermatol. 2014;89(5):771–82.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Puches R, Smolle J, Rieger E, Soyer HP, Kerl H. Expression of cytoskeletal components in melanocytic skin lesions. An immunohistochemical study. Am J Dermatopathol. 1991;13(2):137–44.
20. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindström M, Ivaska J, Ny T, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-β-Slug signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(30):E4320-4327.
21. Miot HÁ. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais.J Vasc

Bras. 2017;6(2):88-91
22. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics: The Bare Essentials. 3rd edition. Shelton (CN): PMPH; 2007.
23. Weichle T, Hynes DM, Durazo-Arvizu R, Tarlov E, Zhang Q. Impact of alternative approaches to assess outlying and influential observations on health care costs. Springerplus. 2013;2(1):614.
24. Miot HA. Sample size in clinical and experimental trials. J Vasc Bras. 2011;10(4):275-278.
25. Qiao Z, Wang X, Xiang L, Zhang C. Dysfunction of Autophagy: A Possible Mechanism Involved in the Pathogenesis of Vitiligo by Breaking the Redox Balance of Melanocytes. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:3401570.
26. Gęgotek A, Skrzydlewska E. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. Arch Dermatol Res. 2015;307(5):385–96.
27. Gruber F, Mayer H, Lengauer B, Mlitz V, Sanders JM, Kadl A, et al. NF-E2-related factor 2 regulates the stress response to UVA-1-oxidized phospholipids in skin cells. FASEB J. 2010;24(1):39–48.
28. Nagar R. Autophagy: A brief overview in perspective of dermatology. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2017;83:290-7
29. 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.
30. He Y, Li S, Zhang W, Dai W, Cui T, Wang G, et al. Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H2O2-induced oxidative stress in vitiligo. Sci Rep. 2017;10;7:42394.
31. Zhang C-F, Gruber F, Ni C, Mildner M, Koenig U, Karner S, et al. Suppression of autophagy dysregulates the antioxidant response and causes premature senescence of melanocytes. J Invest Dermatol. 2015;135(5):1348–57.
32. Ni C, Narzt M-S, Nagelreiter I-M, Zhang CF, Larue L, Rossiter H, et al. Autophagy deficient melanocytes display a senescence associated secretory phenotype that includes oxidized lipid mediators. Int J Biochem Cell Biol. 2016;81(Pt B):375–82.
33. 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.
34. Cassiano D, Esposito Lemos AC, Hassun K, Bagatin E, Lima MMDA, Lima EVA, et al. Efficacy and safety of microneedling and oral tranexamic acid in the treatment of facial melasma in women: an open, evaluator-blinded, randomized clinical trial. J Am Acad Dermatol. 2020;ahead of print.
35. 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.
36. Shin J, Kim J-H, Kim EK. Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012;26(12):1577–80.
37. Yamamoto T, Sawada Y, Katayama I, Nishioka K. Local expression and systemic release of stem cell factor in systemic sclerosis with diffuse hyperpigmentation. Br J Dermatol. 2001;144(1):199–200.
38. Yoon JE, Kim Y, Kwon S, Kim M, Kim YH, Kim J-H, et al. Senescent fibroblasts drive ageing pigmentation: A potential therapeutic target for senile lentigo. Theranostics. 2018;8(17):4620–32.
39. 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.
40. Langer R, Neppl C, Keller MD, Schmid RA, Tschan MP, Berezowska S. Expression Analysis of Autophagy Related Markers LC3B, p62 and HMGB1 Indicate an Autophagy-Independent Negative Prognostic Impact of High p62 Expression in Pulmonary Squamous Cell Carcinomas. Cancers (Basel). 2018;10(9):281
41. Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. Cell Death Differ. 2015;22(3):419–32.

Terceiro Manuscrito – artigo em avaliação no *Archives of Dermatological Research*

Journal section: Concise communication

Title: Senescent fibroblasts from melasma express proinflammatory and melanogenic factors that contribute to deficient upper dermal repair and sustained melanogenesis.

Running Head: Senescence and melanogenic factors in fibroblasts from melasma.

Authors:

Ana Cláudia Cavalcante Espósito (1)
Dermatologist, M.D., PhD, Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil.
anaclaudiaesposito@gmail.com
ORCID: 0000-0001-9283-2354

Gabrielli Brianezi (2)
Biomedic, PhD, Departamento de Patologia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil.
gabibrianezi@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-3482-0296

Luciane Donida Bartoli Miot (1)
Dermatologist, M.D., PhD, Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil.
lucianemiot@fmb.unesp.br
ORCID: 0000-0002-2388-7842

Hélio Amante Miot (1)
Dermatologist, M.D.; PhD, Associate Professor, Departamento de Dermatologia e

Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil.
heliomiot@gmail.com
ORCID: 0000-0002-2596-9294

Institutions:

1. Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil.
2. Departamento de Patologia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil.

City, state and country in which the work was performed

Botucatu, São Paulo – Brazil.

Correspondence:

Prof. Hélio Amante Miot
Departamento de Dermatologia e Radioterapia, SN.
Campus de Rubião Jr. – Unesp.
Botucatu, SP – Brazil.
CEP 18618-000
Email: heliomiot@gmail.com
Phone/FAX: +55 14 38824922

Word Count: 1948
Figures: 3
Tables: 0

Author contribution for the manuscript:

Study design: HAM, GB, ACCE, LDBM
Data collection and tabulation: HAM, LDBM, GB, ACEE
Data analysis: HAM, ACEE, GB
Paper writing: ALL authors

Final revision and text approval: ALL authors

Abbreviation list

BMZ – basement membrane zone

CCL2 – C-C Motif Chemokine Ligand

CDH – Cadherin

COL – Collagen

CSF – Colony Stimulating Factor

EDN – Endothelin

ESR – Estrogen Receptor

iNOS – inducible nitric oxide synthase

MMP – Metalloproteinase

NF-Kβ – factor nuclear kappa B

PGE2 – prostaglandin E2

PTG – Prostaglandin-Endoperoxide Synthase

SA-β-gal – Senescence β-Galactosidase

SASP – senescence-associated secretory phenotype

SOD – Superoxide dismutase

TGFβ1 – transforming growth factor beta 1

TIMP – Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho;

UV – ultraviolet

VEGF – vascular endothelial growth factor

Funding: FAPESP – Grant no 2012/09233-5, 2012/05004-1; CNPq – Grant no 401309/2016-9.

Ethical approval: This project was approved by the Unesp medical School Review Board (n. 0461-11).

Abstract

There are several upper dermal abnormalities in melasma, and fibroblasts have a central function in pigmentation induction. This study aimed to explore the fibroblast morphology, growth rate and gene expression profile in melasma in comparison to adjacent unaffected skin. Pairs of facial skin biopsies (2 mm) from ten women with facial melasma were taken from melasma and clinically normal adjacent skin, and the fragments were processed for fibroblast culturing. The fibroblasts from five participants were plated, and their growth curves were evaluated after 2, 5 and 8 days. Posteriorly, their senescence was assessed by SA-β-gal staining. For the other five participants, real-time PCR arrays were performed to assess the expression level for 39 genes. Primary fibroblast cultures from melasma skin were morphologically less fusiform and had a mean 34% (CI 95% 4-63%) greater proportion of SA-β-gal stained cells than adjacent skin. Additionally, the cellular growth rate was lower for the melasma samples after eight days in culture ($p < 0.01$). The WNT3A, EDN3, ESR2, PTG2, MMP1 and SOD2 genes were upregulated, and the COL4A1, CSF2, DKK3, COL7A1, TIMP4, CCL2 and CDH11 genes were downregulated in the fibroblasts from melasma skin in comparison to the adjacent unaffected skin. Fibroblasts from melasma skin revealed a more noticeable senescent phenotype than the adjacent photoexposed skin. Moreover, their gene expression profile comprised proinflammatory and melanogenic factors and repair deficits, which can induce upper dermal damage and sustain melanogenesis.

Keywords: Melasma, Ultraviolet rays, Pigmentation disorders, Collagen, Fibroblast, Senescence.

Introduction

Melasma is a common acquired pigmentary disorder due to increased local epidermal melanin unit activity [1, 2]. It affects sun-exposed sites (e.g. the face), mainly in women, throughout their reproductive years [3]. Its pathogenesis is still not fully understood; the roles of skin basement membrane zone alterations, upper dermis damage and fibroblast activity in disease development are matters of recent research [4-7].

In contrast to adjacent photoexposed skin, areas with melasma present epidermal hypermelanization with more mature melanosomes, hypertrophied melanocytes, evident solar elastosis, metalloproteinase (MMP) hyperactivity with collagen degradation and vascular and mast cell prominence as well as the increased expression of inflammatory mediators, such as iNOS (inducible nitric oxide synthase), NF-Kβ (factor nuclear *kappa* β) and endothelin, and growth factors, such as VEGF (vascular endothelial growth factor), stem cell, hepatocyte, fibroblast and nerve growth factor [8-10]. Pendulous melanocytes protruding into the dermis and basement membrane changes have been described in melasma [4]. There is a decrease in type I collagen and an increase in MMP (1, 2, 3 and 9) activity [11-13]. Some genes related to lipid metabolism are downregulated in melasma skin, and the function of the skin barrier is impaired [14-16].

Sun exposure is the major risk factor in melasma development. It induces a skin stress response that causes premature cellular senescence [7]. Apart from photoaging and intrinsic aging, melasma presents a more prominent senescent phenotype in disease-involved skin. The premature cellular senescence induced by ultraviolet (UV) radiation promotes functional alterations that can cause chronic melanogenesis [17, 18].

Fibroblasts have a central function in pigmentation, and the transition to a senescent profile promotes a modification of their autocrine and paracrine activity [18]. Fibroblasts release more stem cell factor and its epidermal receptor c-kit in melasma skin [19]. Senescent fibroblasts can express inflammatory and melanogenic factors that can lead to melasma development [5].

This study aimed to explore the role of fibroblasts in the melasma pathogenesis, focusing on the fibroblast morphology, growth rate and gene expression profile.

Methods

The project was approved by the Institutional Review Board on Ethics (Unesp, Botucatu-SP), and all the participants provided consent to participate.

Pairs of facial skin biopsies (2 mm) from melasma and clinically normal adjacent skin (<2 cm apart) from ten women with facial melasma (26 to 42 years old), without treatment for 30 days except sunscreen, were assessed through a sterile procedure.

The fragments were sectioned and placed in a fibroblast culture, maintained in medium 106 (Gibco™) containing growth factors (LSGS Kit, Gibco™). The fibroblasts were plated at a density of $5x10^3$ in a 12-well cell culture plate.

The fibroblasts from five participants were plated at a density of $1x10^4$ in a 6-well cell culture plate, and the number of cells (growth curve) was evaluated after 2, 5 and 8 days. Posteriorly, their senescence was assessed using a Senescence β-Galactosidase (SA-β-gal) Staining Kit (Cell Signaling Technology®), following the instructions from the manufacturer. The morphology of the fibroblasts under culture and the percentile of cells marked with SA-β-gal were compared between the sites.

For the other five participants, the real-time PCR array (96-well plate, Custom RT^2 Profiler PCR Arrays, Qiagen) was performed on the primary fibroblast cell cultures to assess the gene expression for 39 genes. The total RNA was obtained with an RNase Mini Kit (Qiagen), and the reverse transcription of the RNA was performed using the RT^2 First Strand Kit for RT-PCR (Qiagen), following the instructions from the manufacturer.

The effect size for gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was estimated by the fold change (melasma/adjacent skin) for each participant [20]. The fold changes were represented by their mean and 95% CI, estimated by 10,000 resamples with accelerated bias

correction (BCa).

Results

Primary fibroblast cultures from melasma skin were morphologically less fusiform and had a mean 34% (CI 95% 4-63%) greater proportion of SA-β-gal stained cells than adjacent skin in all samples (**Figure 1**). Additionally, the cellular growth rate was lower for the melasma samples after eight days in culture ($p < 0.01$) (**Figure 2**).

Alterations in gene expression were identified in fibroblast cells isolated from melasma skin compared to those isolated from adjacent healthy skin. The WNT3A, EDN (Endothelin) 3, ESR (Estrogen Receptor) 2, PTG (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase) 2, MMP1 and SOD (Superoxide Dismutase) 2 genes were upregulated, and the COL (Collagen) 4A1, CSF (Colony Stimulating Factor) 2, DKK (Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor) 3, COL7A1, TIMP (Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases) 4, CCL (C-C Motif Chemokine Ligand) 2 and CDH (Cadherin) 11 genes were downregulated (**Figure 3**).

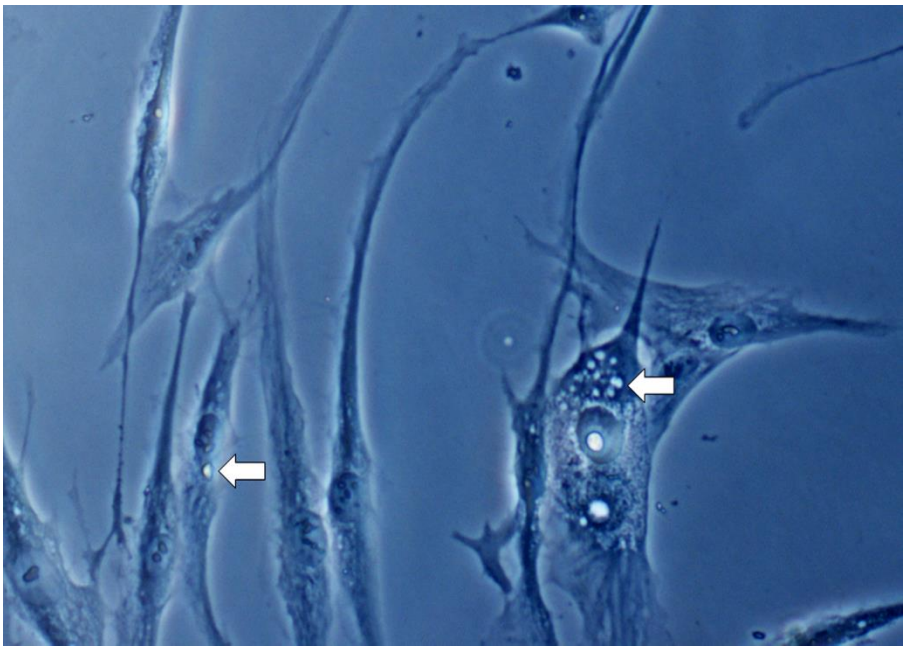


Figure 1. Fibroblast culture from facial melasma (SA-β-gal 400x), frequent cytoplasmic structures (arrows).

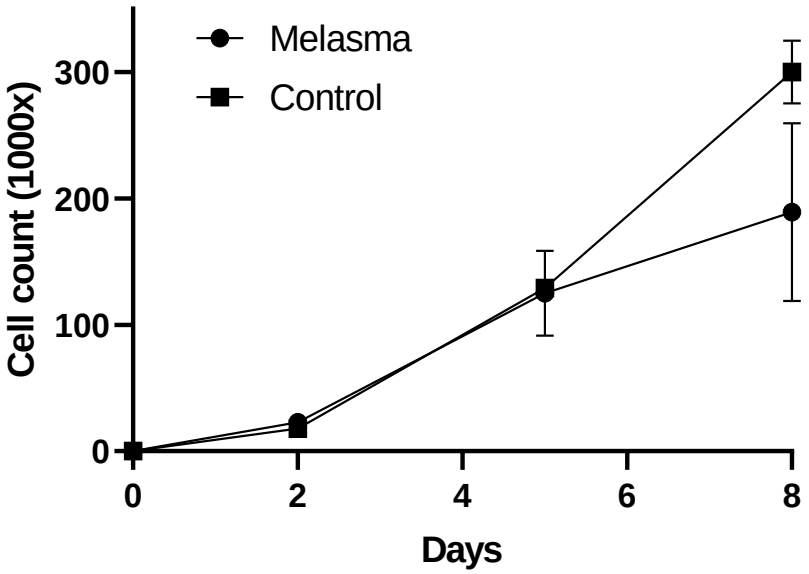


Figure 2. Fibroblast growth curves. Mean (SE) cell count for patients with facial melasma (*n* = 5).

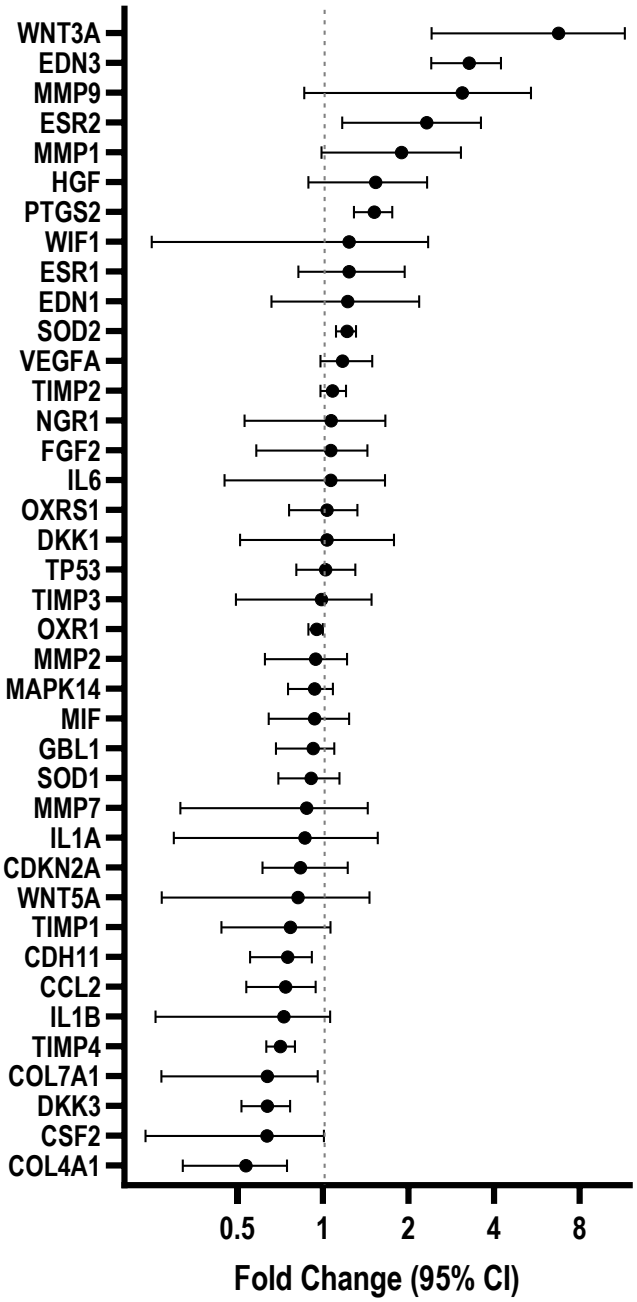


Figure 3. Fold change (Log_2 mean and 95% CI) of the gene expression between facial melasma and unaffected adjacent skin assessed by RT-PCR array (*n* = 5).

Discussion

Melanogenesis is a complex process mediated by paracrine, autocrine and environmental stimuli [21-24]. Phenotypic changes evidenced in melasma skin do not develop primarily or independently from an epidermal disorder since several dermal alterations are evident in comparison to the adjacent photoexposed skin [25].

Fibroblast is the most common cell type in the dermis, and, due to its long life, it accumulates damage in its cellular machinery, which can result in functional and morphologic changes [18]. Intrinsic aging and photoaging are associated with a decrease in the number and proliferation rate of fibroblasts, and the comparison of the gene profile to an adjacent photoexposed area reinforces that the alteration of fibroblasts from melasma-affected skin is independent of age and photoexposition [5, 26]. Considering the importance of dermal fibroblasts in pigment regulation, the modifications of their autocrine and paracrine activity can influence pigmentary disorders [18]. In this study, we identified the loss of fusiform morphology in fibroblasts with a great amount of cytoplasmic SA-β-gal and a lower growth rate in melasma. These morphological and metabolic alterations endorse a senescent phenotype in fibroblasts from melasma skin.

Senescence is a major factor in aging mechanisms, and senescence-associated secretory phenotype (SASP) is known to be the main driver of age-related phenotypes, such as wrinkling and pigmentation [27]. Notably, there is some evidence about phenotype differences related to ethnicity and susceptibility to fibroblast senescence [28, 29]. Senescent fibroblasts secrete inflammatory cytokines and stem cell factor, which promote collagen degradation through MMP activation, and have reduced mitotic potential. These issues increase stromal degradation and impair the process of tissue repair, as evidenced in melasma dermis [30]. Therefore, a skin structure mosaic of tissue susceptibility to senescence can be theorized for melasma development under environmental stimuli, such as UV radiation and sexual hormones [31, 32].

There was increased gene expression of MMP1 and decreased expression

of collagen IV (COL4A1), COL7A1 and TIMP4 by fibroblasts isolated from melasma-affected skin. During the senescence process, a progressively enhanced production of metalloproteinase and a decreased repair process are observed [18]. Additionally, in dermal fibroblasts, α-MSH upregulates interstitial collagenase and attenuates the induction of TGFβ1 (transforming growth factor beta 1) in collagen synthesis. Damage to the upper dermis and basement membrane zone can facilitate the transit of melanogenic factors to the basal layer. In this study, despite a marginal implication, MMP9 demonstrated a high fold change (>2), which, in addition to the lower expression of TIMP1 and 4, suggests that fibroblasts from melasma-affected skin are implicated in deficient upper dermal repair.

The role of sex hormones in the skin expression of estrogen receptor-β in melasma is well established [33, 34]. In general, ESR2 is expressed in the process of repair [35-37]. The upper dermis and basement membrane are highly damaged in melasma-affected skin, in comparison to photoexposed and photoprotected skin [2, 25]. Furthermore, estrogen, α-MSH and HGF stimulate melanogenesis by directly binding to the melanocyte receptor and are released in wound healing [24, 38-40]. These findings indicate that the chronic and unsuccessful upper dermal repair process can induce melanogenesis in melasma.

Some genes related to the Wnt pathway were altered in fibroblasts from melasma-affected skin; the inhibitory DKK3 was downregulated, while WNT3A was overexpressed. WNT3A plays an important role in regulating melanocyte precursor proliferation and differentiation [41]. In mature melanocytes, WNT3A increases the melanin content and tyrosinase activity [42]. The Wnt pathway is implicated in the physiopathology of melasma, and the decrease of fibroblast expression of the inhibitory DKK3 can influence the epidermal activation of WNT1 [6]. Additionally, WNT3A is important to tissue repair, which can be activated by upper dermal damage [24, 43, 44].

EDN3 is a 21-amino acid peptide and preferentially activates EDNRB [45]. EDN3-signaling is important in the normal development of epidermal and choroidal melanocytes, acting during proliferation, differentiation and cellular survival [46]. Keratinocytes exposed to ultraviolet B increase the production and secretion of EDN,

triggering adjacent melanocytes to activate the melanogenic cascade. Furthermore, melanocytes exposed to the same radiation present an increase in the expression of c-KIT and EDNRB [46]. EDN3 also participates in fibroblast chemotaxis, regardless of prolonging cell survival and differentiation [47].

Fibroblast senescence is associated with deficient skin immune responses and tumor suppression, but SASP can vary among tissues and stimulus types [48-50]. CSF participates in melanocyte growth, differentiation and survival, as well as stem cell recruitment. Keratinocytes exposed to UVA in vitro present a higher level of CSF [51]. Furthermore, keratinocyte-produced IL-1 induces fibroblasts to synthesize CSF, which promotes keratinocyte proliferation and differentiation. A CSF decrease in senescent fibroblasts can configure a reduction in stimuli to keratinocytes, which hinder the repair of damaged tissue [52, 53].

CCL2 is a chemokine that acts as a critical regulator of macrophage and stem cell recruitment during wound healing, cancer and infection [54, 55]. There is a constitutional downregulation of CCL2 in melanocytes from darkly in comparison to lightly pigmented skin after cell stimulation with lipopolysaccharide [56]. The profile of CCL2 expression in fibroblasts can induce the darker focal phenotype of melasma.

Proteins of the cadherin family play an important role in regulating intercellular adhesion and extracellular matrix synthesis and contribute to signaling events that control cellular homeostasis [57]. In skin fibroblasts, CDH11 regulates collagen and elastin synthesis, and its downregulation can influence the decrease in upper dermal repair in melasma [58].

SOD is part of the enzymatic antioxidant system and is the primary enzyme responsible for the clearance of free oxygen radicals by converting superoxide anions to hydrogen peroxide and oxygen [59]. SOD is a complex of intracellular enzymes, and the serum level of SOD is higher among patients with melasma when compared to controls, which indicates an increased systemic oxidative status and supports the use of antioxidants in melasma treatment [60]. SOD2 is a tetrameric enzyme and contains manganese, which is directed to the mitochondrial intermembrane space. The increase of SOD2 identified in fibroblasts is part of a stress environment and can be the result of multiple inflammatory cytokines; in addition, it is a characteristic

phenotype in senescent fibroblasts [59, 61].

The fibroblast is the most abundant cell in PTGS content. This enzyme participates in prostaglandin E2 (PGE2) synthesis from arachidonic acid, and PGE2 inhibits collagen production by fibroblasts in vitro [62]. The induction of PTGS is noteworthy in senescent cells, which increase the release of PGE2, leading to a reduction in the synthesis of type I collagen, vasodilatation and chemotaxis [62]. Furthermore, PGE2 can directly induce melanogenesis and melanocyte dendrites after UV irradiation [63, 64]. The proinflammatory phenotype of fibroblasts in melasma can induce upper dermal damage and sustained melanogenesis.

This study has limitations regarding the small sample size and lack of proteomic or functional assays to confirm the findings. Nevertheless, the results were consistent and allowed exploration of the hypothesis on the role of fibroblasts in melasma pathogenesis. Further studies should investigate the regulators of those pathways and the cytokine network among keratinocytes, melanocytes, nerves, the endothelium and fibroblasts in melasma, preferably with primary cell cultures, for genomic, proteomic and functional experiments.

Conclusion

Fibroblasts from melasma skin revealed a more noticeable senescent phenotype than the adjacent photoexposed skin. Moreover, their gene expression profile comprised proinflammatory and melanogenic factors and repair deficits, which can induce upper dermal damage and the focal pigmentary phenotype.

References:

1. Brianezi G, Handel AC, Schmitt JV et al. (2015) Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. J Eur Acad Dermatol Venereol 29:809-812
2. Espósito ACC, Brianezi G, De Souza NP et al. (2020) Exploratory Study of Epidermis, Basement Membrane Zone, Upper Dermis Alterations and Wnt Pathway Activation in Melasma Compared to Adjacent and Retroauricular Skin. Ann Dermatol 32:101-108
3. Handel AC, Miot LD, Miot HA (2014) Melasma: a clinical and epidemiological review. An Bras Dermatol 89:771-782
4. Esposito ACC, Brianezi G, De Souza NP et al. (2019) Ultrastructural characterization of damage in the basement membrane of facial melasma. Arch Dermatol Res
5. Byun JW, Park IS, Choi GS et al. (2016) Role of fibroblast-derived factors in the pathogenesis of melasma. Clin Exp Dermatol 41:601-609
6. Esposito ACC, Brianezi G, De Souza NP et al. (2018) Exploring pathways for sustained melanogenesis in facial melasma: an immunofluorescence study. Int J Cosmet Sci 40:420-424
7. Shin J, Kim JH, Kim EK (2012) Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence. J Eur Acad Dermatol Venereol 26:1577-1580
8. Passeron T (2013) Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. J Eur Acad Dermatol Venereol 27 Suppl 1:5-6
9. Miot LD, Miot HA, Polettini J et al. (2010) Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. Am J Dermatopathol 32:676-682
10. Samaka RM, Bakry OA, Shoeib MA et al. (2014) Expression of iNOS and NF-kappaB in melasma: an immunohistochemical study. Anal Quant Cytopathol Histpathol 36:245-257
11. Lee DJ, Park KC, Ortonne JP et al. (2012) Pendulous melanocytes: a characteristic feature of melasma and how it may occur. Br J Dermatol 166:684-686
12. Lee AY (2015) Recent progress in melasma pathogenesis. Pigment Cell Melanoma Res 28:648-660
13. Rodriguez-Arambula A, Torres-Alvarez B, Cortes-Garcia D et al. (2015) CD4, IL-17, and COX-2 Are Associated With Subclinical Inflammation in Malar Melasma. Am J Dermatopathol 37:761-766
14. Kang HY, Suzuki I, Lee DJ et al. (2011) Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. J Invest Dermatol 131:1692-1700
15. Lee DJ, Lee J, Ha J et al. (2012) Defective barrier function in melasma skin. J Eur Acad Dermatol Venereol 26:1533-1537
16. Torres-Alvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cazares JP et al. (2011) Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. Am J Dermatopathol 33:291-295
17. Kim M, Kim SM, Kwon S et al. (2019) Senescent fibroblasts in melasma pathophysiology. Exp Dermatol 28:719-722
18. Bellei B, Picardo M (2020) Premature cell senescence in human skin: Dual face in chronic acquired pigmentary disorders. Ageing Res Rev 57:100981
19. Kang HY, Hwang JS, Lee JY et al. (2006) The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. Br J Dermatol 154:1094-1099
20. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408
21. Videira IF, Moura DF, Magina S (2013) Mechanisms regulating melanogenesis*. An Bras Dermatol 88:76-83
22. Costin GE, Hearing VJ (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. FASEB J 21:976-994

23. Imokawa G (2004) Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. Pigment Cell Res 17:96-110
24. Yamaguchi Y, Hearing VJ (2009) Physiological factors that regulate skin pigmentation. Biofactors 35:193-199
25. Passeron T, Picardo M (2018) Melasma, a photoaging disorder. Pigment Cell Melanoma Res 31:461-465
26. Gruber F, Kremslehner C, Eckhart L et al. (2020) Cell aging and cellular senescence in skin aging - Recent advances in fibroblast and keratinocyte biology. Exp Gerontol 130:110780
27. Yoon JE, Kim Y, Kwon S et al. (2018) Senescent fibroblasts drive ageing pigmentation: A potential therapeutic target for senile lentigo. Theranostics 8:4620-4632
28. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C et al. (2013) Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. J Eur Acad Dermatol Venereol 27:151-156
29. Chang EA, Tomov ML, Suhr ST et al. (2015) Derivation of Ethnically Diverse Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines. Sci Rep 5:15234
30. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ et al. (2010) The essence of senescence. Genes Dev 24:2463-2479
31. Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV (2010) Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. Trends Mol Med 16:7-16
32. Gronniger E, Weber B, Heil O et al. (2010) Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. PLoS Genet 6:e1000971
33. Tamega Ade A, Miot HA, Moco NP et al. (2015) Gene and protein expression of oestrogen-beta and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. Int J Cosmet Sci 37:222-228
34. Videira IF, Moura DF, Magina S (2013) Mechanisms regulating melanogenesis. An Bras Dermatol 88:76-83
35. Kim NH, Cheong KA, Lee TR et al. (2012) PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in melasma. J Invest Dermatol 132:2622-2631
36. Campbell L, Emmerson E, Davies F et al. (2010) Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor beta independent of its antiinflammatory activities. J Exp Med 207:1825-1833
37. Hosokawa M, Ishii M, Inoue K et al. (1981) Estrogen induces different responses in dermal and lung fibroblasts: special reference to collagen. Connect Tissue Res 9:115-120
38. De Souza KS, Cantaruti TA, Azevedo GM, Jr. et al. (2015) Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone. Exp Dermatol 24:198-203
39. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM et al. (2000) Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. FASEB J 14:2525-2531
40. Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev 83:835-870
41. Chang CH, Tsai RK, Tsai MH et al. (2014) The roles of Frizzled-3 and Wnt3a on melanocyte development: in vitro studies on neural crest cells and melanocyte precursor cell lines. J Dermatol Sci 75:100-108
42. Guo H, Yang K, Deng F et al. (2012) Wnt3a inhibits proliferation but promotes melanogenesis of melan-a cells. Int J Mol Med 30:636-642
43. Park TJ, Kim M, Kim H et al. (2014) Wnt inhibitory factor (WIF)-1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes. Pigment Cell Melanoma Res 27:72-81
44. Luscan A, Shackleford G, Masliah-Planchon J et al. (2014) The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. Clin Cancer Res 20:358-371
45. Bondurand N, Dufour S, Pingault V (2018) News from the endothelin-3/EDNRB signaling pathway: Role during enteric nervous system development and involvement in neural crest-associated disorders. Dev Biol 444 Suppl 1:S156-S169
46. Terazawa S, Imokawa G (2018) Signaling Cascades Activated by UVB in Human Melanocytes Lead to the Increased Expression of Melanocyte Receptors, Endothelin B

Receptor and c-KIT. Photochem Photobiol 94:421-431
47. Peacock AJ, Dawes KE, Shock A et al. (1992) Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 7:492-499
48. Wallis R, Mizen H, Bishop CL (2020) The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. Mech Ageing Dev 189:111263
49. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A et al. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol 5:99-118
50. Ghosh K, Capell BC (2016) The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. J Invest Dermatol 136:2133-2139
51. Bastonini E, Kovacs D, Picardo M (2016) Skin Pigmentation and Pigmentary Disorders: Focus on Epidermal/Dermal Cross-Talk. Ann Dermatol 28:279-289
52. Imokawa G, Yada Y, Kimura M et al. (1996) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis. Biochem J 313 (Pt 2):625-631
53. Russo B, Brembilla NC, Chizzolini C (2020) Interplay Between Keratinocytes and Fibroblasts: A Systematic Review Providing a New Angle for Understanding Skin Fibrotic Disorders. Front Immunol 11:648
54. Brummer G, Acevedo DS, Hu Q et al. (2018) Chemokine Signaling Facilitates Early-Stage Breast Cancer Survival and Invasion through Fibroblast-Dependent Mechanisms. Mol Cancer Res 16:296-308
55. Ohgo S, Hasegawa S, Hasebe Y et al. (2015) Senescent dermal fibroblasts enhance stem cell migration through CCL2/CCR2 axis. Exp Dermatol 24:552-554
56. Tam I, Dzierzega-Lecznar A, Stepien K (2019) Differential expression of inflammatory cytokines and chemokines in lipopolysaccharide-stimulated melanocytes from lightly and darkly pigmented skin. Exp Dermatol 28:551-560
57. Yulis M, Kusters DHM, Nusrat A (2018) Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators. J Physiol 596:3883-3898
58. Row S, Liu Y, Alimperti S et al. (2016) Cadherin-11 is a novel regulator of extracellular matrix synthesis and tissue mechanics. J Cell Sci 129:2950-2961
59. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med 33:337-349
60. Choubey V, Sarkar R, Garg V et al. (2017) Role of oxidative stress in melasma: a prospective study on serum and blood markers of oxidative stress in melasma patients. Int J Dermatol 56:939-943
61. Treiber N, Maity P, Singh K et al. (2012) The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. Dermatoendocrinol 4:232-235
62. Li Y, Lei D, Swindell WR et al. (2015) Age-Associated Increase in Skin Fibroblast-Derived Prostaglandin E2 Contributes to Reduced Collagen Levels in Elderly Human Skin. J Invest Dermatol 135:2181-2188
63. Fu C, Chen J, Lu J et al. (2020) Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). Mol Med Rep 21:1421-1430
64. Starner RJ, Mcclelland L, Abdel-Malek Z et al. (2010) PGE(2) is a UVR-inducible autocrine factor for human melanocytes that stimulates tyrosinase activation. Exp Dermatol 19:682-684

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 morfologicamente 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.

Perspectivas

A Internet proporcionou novas modalidades de coletas de dados clínicos multicêntricos, caracterizando uma forma de produção de conhecimento e tecnologia. O interesse da população, especialmente dos próprios pacientes, em pesquisar e se informar sobre melasma tem aumentado e as ferramentas de busca na Internet facilitam o acesso à informação. Nosso grupo tem desenvolvido um estudo que busca analisar o interesse sobre o tema na última década nas buscas realizadas *online*, além de avaliar ocorrência de padrões (como sazonalidade de busca relacionada a sazonalidade do agravamento das lesões).

O comprometimento da qualidade de vida nos pacientes com melasma facial já é bem documentado. Entretanto, não há estudos que investigaram a prevalência de quadros de ansiedade, depressão e comprometimento da autoestima. Um estudo transversal tipo inquérito baseado na Internet (*crowdsourcing*) está sendo desenvolvido para tentar elucidar estas questões.

O papel da radiação ultravioleta no desencadeamento da doença é bem estabelecido. No entanto, a participação da luz visível (especialmente da luz azul) passou a ser muito questionada, na medida em que há um incremento na prevalência da doença, ao mesmo tempo que aumenta a exposição da população a dispositivos eletrônicos emissores, como celulares e computadores.

As evidências atuais indicam que tais dispositivos não são capazes de agravar o melasma via receptor OPN3. Entretanto, são necessários estudos futuros que avaliem outros receptores para luz visível.

Também se faz necessário comparar diferentes filtros solares como adjuvantes no clareamento do melasma. Um estudo comparativo entre fotoprotetor com cor e alto PPD (*Persistent Pigment Darkening* – valor numérico referente ao fator de proteção contra UVA) e fotoprotetor translúcidos de alto PPD poderia definir de forma mais definitiva o papel da luz visível e da UVA no estímulo à pigmentação do melasma.

A redução na autofagia dos melanócitos da camada basal propicia, em via final, acúmulo inapropriado de melanina disfuncional. Estudos que objetivem compreender os mecanismos promotores do comprometimento autofágico serão valiosos.

Até o momento, a maioria dos tratamentos disponíveis tem como alvo apenas a redução nos estoques de melanina, sem atuar sobre sua etiologia. A melatonina e o ácido tranexâmico oral têm potencial de estimular a autofagia e já foram descritos como opções terapêuticas. A avaliação comparativa da expressão de LC3B na pele com melasma, antes e após os tratamentos com tais drogas, pode ser uma forma simples e elegante de estudar os mecanismos através do qual atuam.

Estudos recentes *in vitro* evidenciaram que a metformina reduz a quantidade de melanina sintetizada, via *dowregulation* do MITF. São necessários ensaios clínicos que avaliem sua eficácia e segurança quando associada ao tratamento padrão-ouro atual. Outra medicação com potencial é o sirolimus, já que a inibição de mTOR tem sido alvo de pesquisas em desordens pigmentares.

O melasma é uma doença complexa, cujas vias que promovem sua pigmentação ainda estão sendo descritas. Estudos fisiopatológicos, como este, ampliam o conhecimento sobre a doença, ao mesmo tempo em que alertam para possíveis alvos terapêuticos.

Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA E RADIOTERAPIA – FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

Você foi convidado(a) a participar de um projeto chamado "Avaliação da autofagia e senescência na epiderme e derme superior na pele com melasma em comparação com a pele sã adjacente.", que pretende estudar alguns fenômenos que ocorrem na pele com melasma em comparação com a pele adjacente sã.

A pesquisa constará da realização de dois encontros. No primeiro dia da pesquisa, será avaliado seu rosto, fotografado, realizado duas biópsias (remoção de um pequeno fragmento de pele) – área de lesão e pele saudável ao redor. A biópsia é a retirada de uma pequena porção circular de pele de 3mm de diâmetro após anestesia local por meio de uma lâmina médica. O procedimento será feito em área mais lateral da face (para não comprometer a estética). No local da biópsia será dado um ponto com fio bastante fino. São possíveis complicações do procedimento: dor, infecção local e marca no local do procedimento.

Esta pequena porção de pele retirada será totalmente utilizada até o fim do projeto. Durante o desenvolvimento do Projeto, as amostras ficarão armazenadas no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno Fetal, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP – campus de Botucatu), sendo o telefone de contato: (14) 3880-1590.

Após 7 dias, haverá um segundo encontro, apenas para retirada do ponto das duas biópsias

As fotos serão tiradas com finalidade científica ou de educação médica. Dessa maneira, podem ser publicadas em artigo científico ou livro texto, postas em circulação, inclusive na internet ou apresentadas, isoladas ou acompanhadas por assuntos escritos, impressos, gráficos ou áudios, aos profissionais de saúde e/ou público leigo em geral. Os dados pessoais serão totalmente preservados e anonimizados.

Os riscos potenciais do estudo são: infecção e marca no local da realização da biópsia.

Os benefícios do estudo são as contribuições que seus resultados trarão na compreensão do melasma, doença ainda sem cura e que acomete 35% das mulheres brasileiras de 18 a 50 anos. O entendimento dos mecanismos que levam a esta doença poderá, no futuro, ser a base para o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença. Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento ou preferência de agendamento médico. Você poderá retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo. É garantido total sigilo do seu nome em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via desse termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisados por 5 anos.

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

Nome do paciente:_____

Assinatura:_____

Pesquisador - Assinatura:_____

Orientador: Hélio Amante Miot, Rua Magnólia, 400, Botucatu. Fone: (14) 3882-4922. E-mail: heliomiot@fmb.unesp.br;

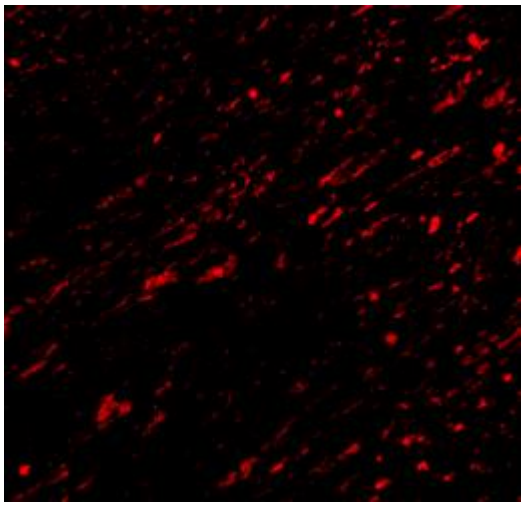
Pesquisadora: Ana Cláudia Cavalcante Espósito Lemos, Rua José Alfredo da Silva, 590. Fone: (18) 3222-2126. E-mail: anaclaudiaesposito@gmail.com

Apêndice 2. Protocolo e controles da imunofluorescência de tripla marcação por anti-OPN3, anti-vimentina, DAPI

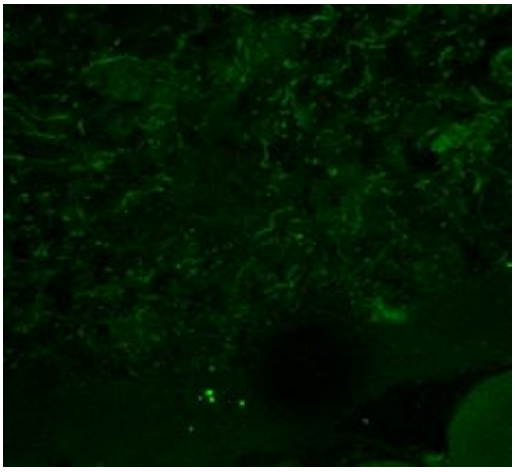
Protocolo

- Desparafinização, hidratação e recuperação antigênica em **Trilogy® 1:20 na panela de pressão a 117ºC por 3 minutos;**
- Após 1 hora, lavagem das lâminas duas vezes em Soro Bovino Fetal;
- **Bloqueio de proteínas inespecíficas em leite 5%** por 60 minutos;
- Sem lavar as lâminas, aplicado anticorpo ***rabbit* anti-OPN3 (ab228748, Abcam, Cambridge - MA, EUA) 1:150** diluído em Emerald®. Mantido *overnight* a 4ºC (em geladeira).
- No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes em Soro Bovino Fetal;
- Aplicado anticorpo secundário **Alexa Fluor 594 1:500** (diluído em Emerald®) por 60 minutos em ambiente escuro;
- Após lavagem das lâminas em Soro Bovino Fetal, colocado o anticorpo ***mouse* anti-vimentina (ab8978 Abcam, Cambridge - MA, EUA) 1:100** diluído em Emerald® e mantido por 120 minutos;
- Depois de lavagem minuciosa em Soro Bovino Fetal, foi aplicado **Alexa Fluor 488 1:500** diluído em Emerald® sobre as lâminas e assim mantido por 30 minutos em ambiente escuro;
- Após, lâminas foram lavadas em Soro Bovino Fetal;
- Aplicado de **DAPI** também em ambiente escuro;
- Colocado lamínula.
- Avaliação microscopia confocal LEICA TCS SP8.

Controle positivo OPN3 – câncer de mama



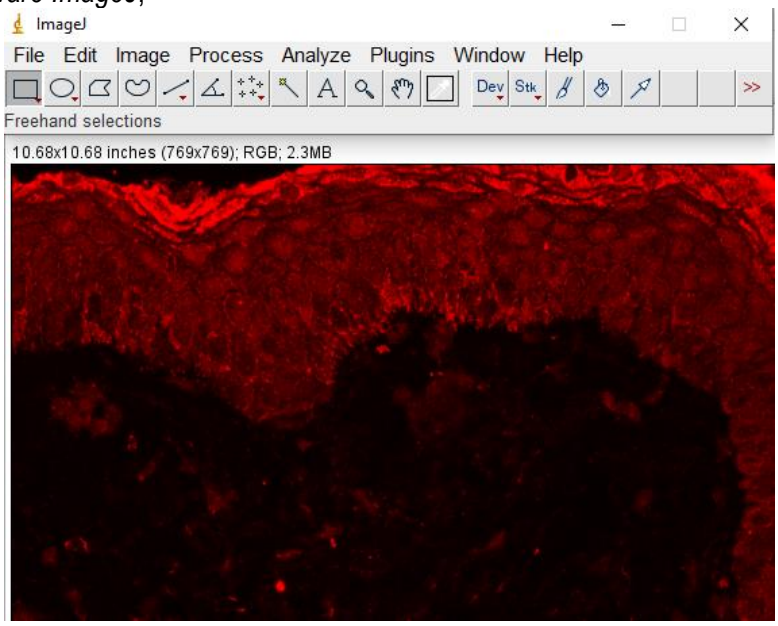
Controle positivo vimentina – carcinoma hepático



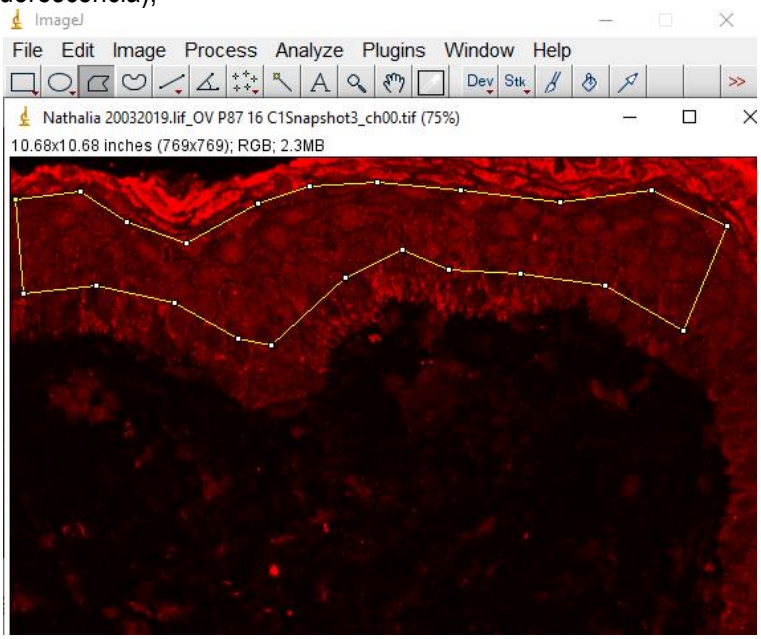
Apêndice 3. Avaliação de OPN3 através do *software ImageJ*

a) Avaliação da marcação nos queratinócitos epidérmicos

- Abrir o arquivo correspondente ao OPN3 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;



- Seleção da camada suprabasal até granulosa (excluindo a córnea devido autofluorescência);



- Comando “medir” – valor da mediana;

Results

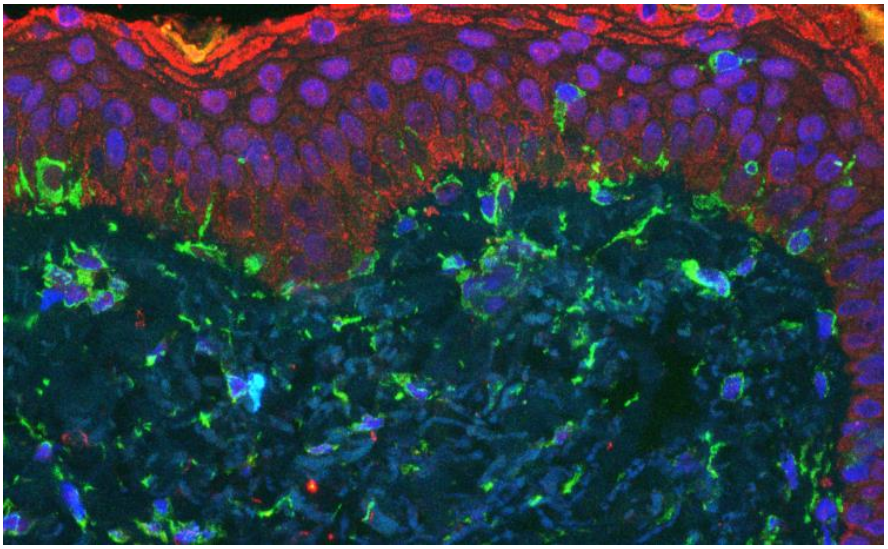
File Edit Font Results

	Area	Mean	StdDev	Min	Max	IntDen	Median	%Area	RawIntDen
1	12.489	28.136	8.762	8	85	351.386	27	0	1822042

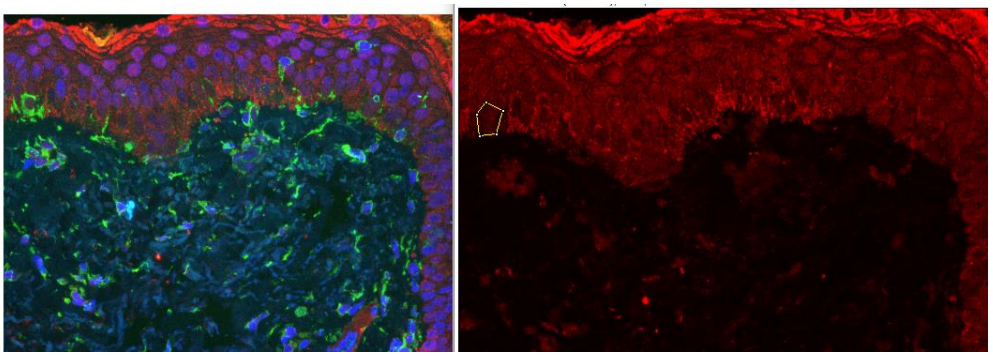
- Cada lâmina foi fotografada três vezes (regiões diferentes) e cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

b) Avaliação da marcação nos melanócitos basais

- Abrir o arquivo correspondente ao OPN3 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição OPN3, DAPI e vimentina em paralelo;



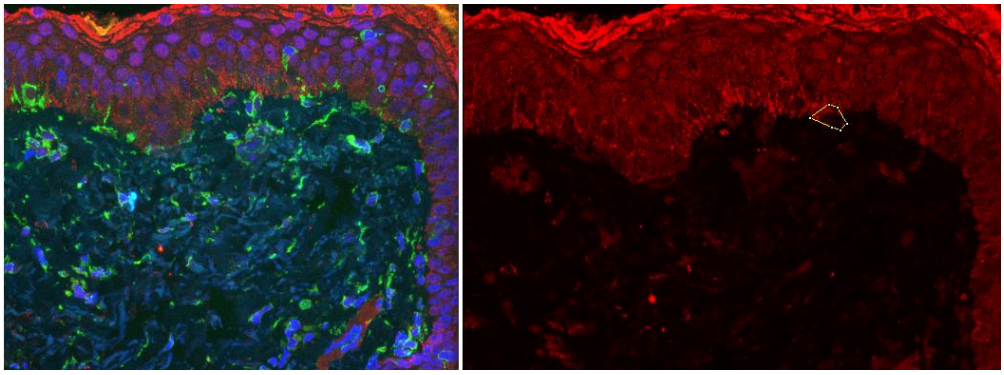
- Localizar os melanócitos da camada basal na foto sobreposta (células basais com morfologia típica, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar os melanócitos da basal um a um;



- Comando “medir” – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os melanócitos da camada basal representados na foto;
- Cada lâmina foi fotografada três vezes (em regiões diferentes) e cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

c) Avaliação da marcação nos melanócitos em pêndulo

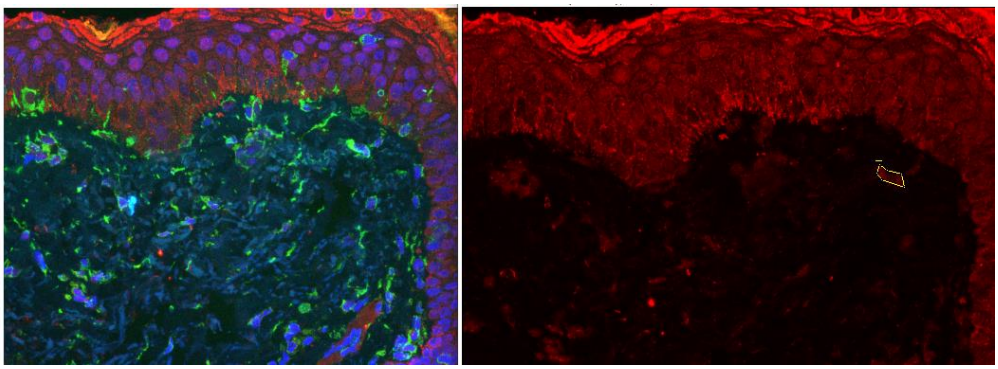
- Abrir arquivo correspondente ao OPN3 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição OPN3, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os melanócitos em pêndulo na foto sobreposta (células da camada basal com morfologia típica que se projetam em direção à derme, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar os melanócitos em pêndulo individualmente;



- Comando “medir” – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os melanócitos em pêndulo representados na foto;
- Cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

d) Avaliação da marcação nos fibroblastos da derme superior

- Abrir arquivo correspondente ao OPN3 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição OPN3, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os fibroblastos da derme superior na foto sobreposta (células estreladas na derme superior, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar as células de interesse individualmente;



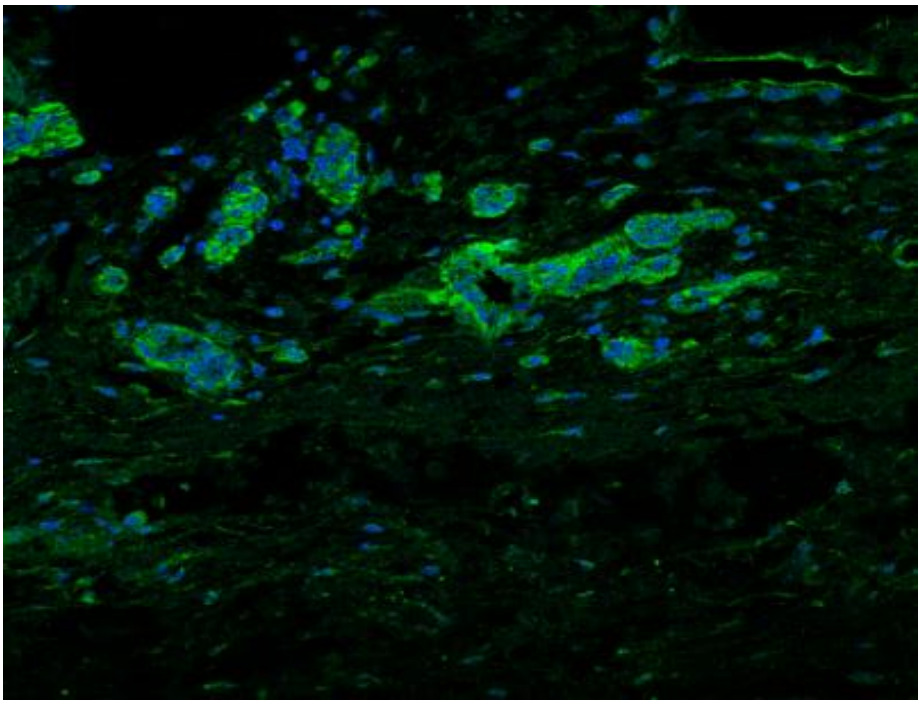
- Comando “medir” – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os fibroblastos da derme superior representados na foto;
- Cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

Apêndice 4. Protocolo e controle da imunofluorescência de tripla marcação por anti-LC3B, anti-vimentina, DAPI

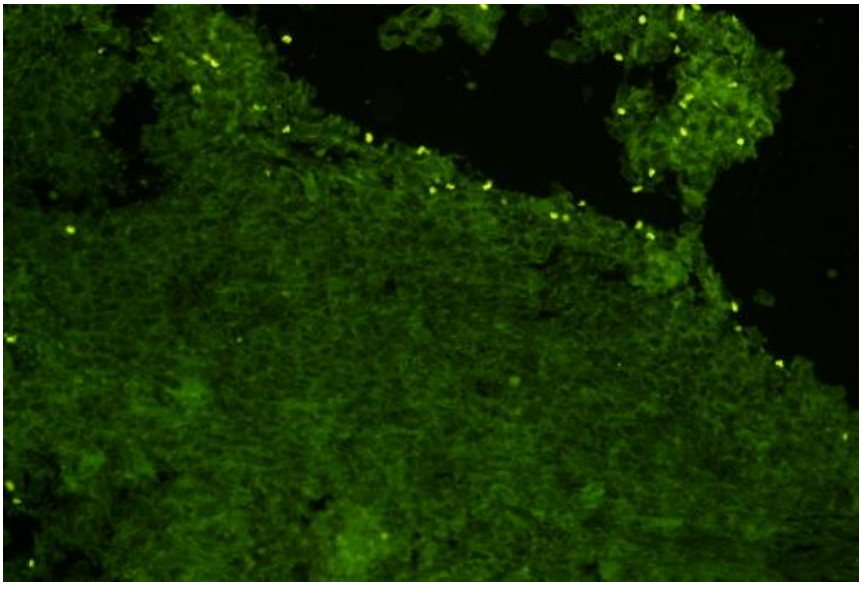
Protocolo

- Desparafinização, hidratação e recuperação antigênica em **Trilogy® 1:20 na panela de pressão a 117ºC por 3 minutos;**
- Após 1 hora, lavagem das lâminas duas vezes em Soro Bovino Fetal;
- **Bloqueio de proteínas inespecíficas em leite 5%** por 60 minutos;
- Sem lavar as lâminas, aplicado anticorpo ***rabbit* anti-LC3B (ab51520, Abcam, Cambridge - MA, EUA) a 1:250** diluído em Emerald®. Mantido *overnight* a 4ºC (em geladeira).
- No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes em Soro Bovino Fetal;
- Aplicado anticorpo secundário **Alexa Fluor 594 1:1000** (diluído em Emerald®) por 60 minutos em ambiente escuro;
- Após lavagem das lâminas em Soro Bovino Fetal, colocado o anticorpo ***mouse* anti-vimentina (ab8978 Abcam, Cambridge - MA, EUA) 1:100** diluído em Emerald® e mantido por 120 minutos;
- Depois de lavagem minuciosa em Soro Bovino Fetal, foi aplicado **Alexa Fluor 488 1:500** diluído em Emerald® sobre as lâminas e assim mantido por 30 minutos em ambiente escuro;
- Após, lâminas foram lavadas em Soro Bovino Fetal;
- Aplicado de **DAPI** também em ambiente escuro;
- Colocado lamínula.
- Avaliação microscopia confocal LEICA TCS SP8.

Controle positivo de LC3B – câncer de mama



Controle positivo vimentina – carcinoma hepático

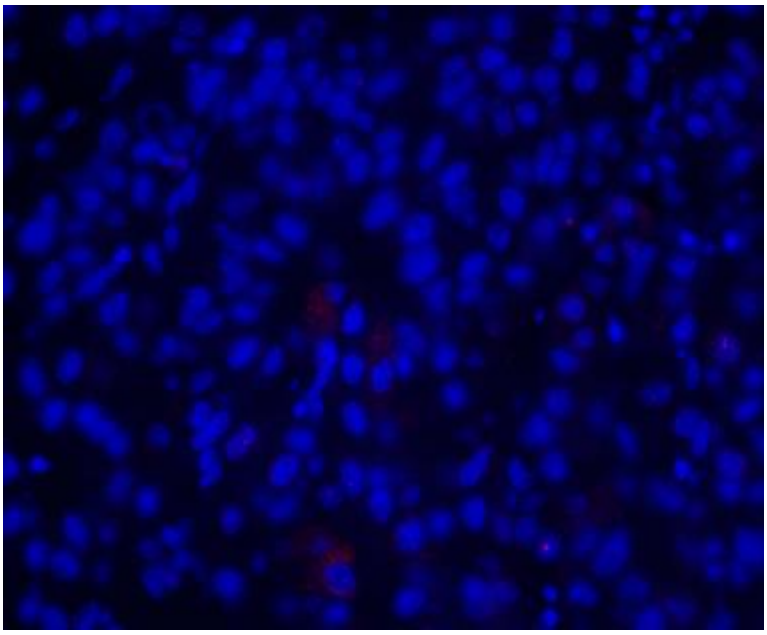


Apêndice 5. Protocolo e controles da imunofluorescência de tripla marcação por anti-p62, anti-vimentina, DAPI

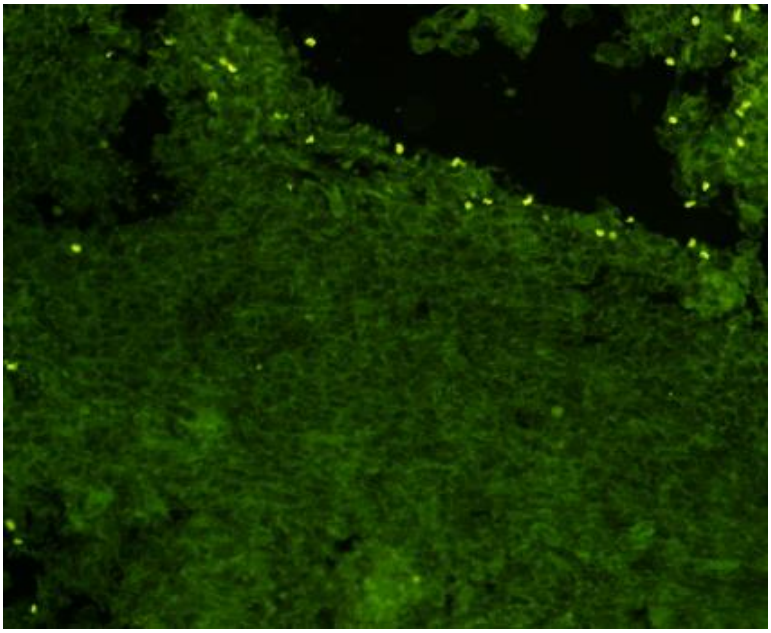
Protocolo

- Desparafinização, hidratação e recuperação antigênica em **Trilogy® 1:20 na panela de pressão a 117ºC por 3 minutos;**
- Após 1 hora, lavagem das lâminas duas vezes em Soro Bovino Fetal;
- **Bloqueio de proteínas inespecíficas em leite 5%** por 60 minutos;
- Sem lavar as lâminas, aplicado anticorpo ***rabbit*** **anti-SQSTM1/p62 (ab91526, Abcam, Cambridge - MA, EUA) 1:50** diluído em Emerald®. Mantido *overnight* a 4ºC (em geladeira).
- No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes em Soro Bovino Fetal;
- Aplicado anticorpo secundário **Alexa Fluor 594 1:500** (diluído em Emerald®) por 60 minutos em ambiente escuro;
- Após lavagem das lâminas em Soro Bovino Fetal, colocado o anticorpo ***mouse*** **anti-vimentina (ab8978 Abcam, Cambridge - MA, EUA) 1:100** diluído em Emerald® e mantido por 120 minutos;
- Depois de lavagem minuciosa em Soro Bovino Fetal, foi aplicado **Alexa Fluor 488 1:500** diluído em Emerald® sobre as lâminas e assim mantido por 30 minutos em ambiente escuro;
- Após, lâminas foram lavadas em Soro Bovino Fetal;
- Aplicado de **DAPI** também em ambiente escuro;
- Colocado lamínula.
- Avaliação microscopia confocal LEICA TCS SP8.

Controle positivo p62 – carcinoma hepático



Controle positivo vimentina – carcinoma hepático

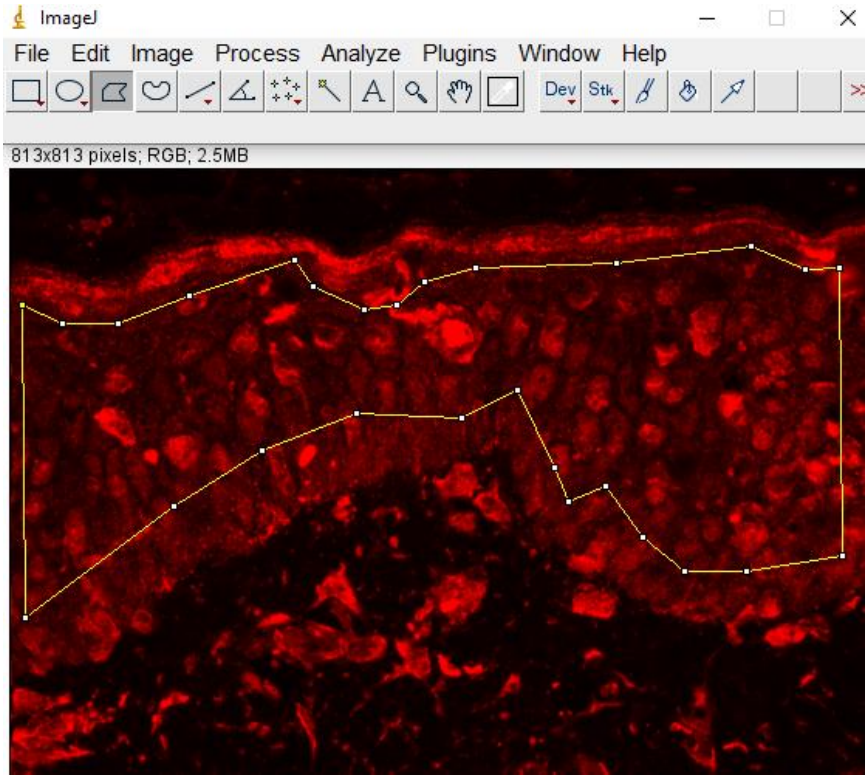


Apêndice 6. Avaliação de LC3B através do *software ImageJ*

a) Avaliação da marcação nos queratinócitos epidérmicos

- Abrir o arquivo correspondente ao LC3B (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;

- Seleção da camada suprabasal até granulosa (excluindo a córnea devido autofluorescência);



- Comando “medir” – valor da mediana;

Results

File Edit Font Results

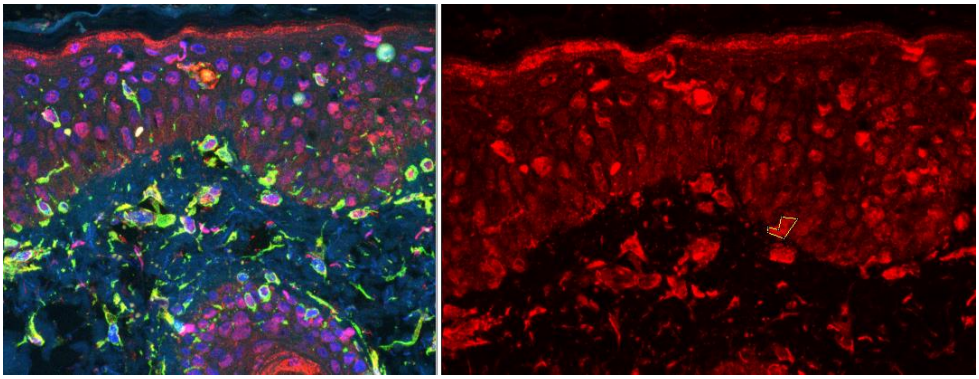
	Area	Mean	StdDev	Min	Max	IntDen	Median	%Area	RawIntDen
1	130784	24.762	14.448	2	85	3238536	21	0	3238536

- Cada lâmina foi fotografada três vezes (regiões diferentes) e cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

b) Avaliação da marcação nos melanócitos basais

- Abrir o arquivo correspondente ao LC3B (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição LC3B, DAPI e vimentina em paralelo;

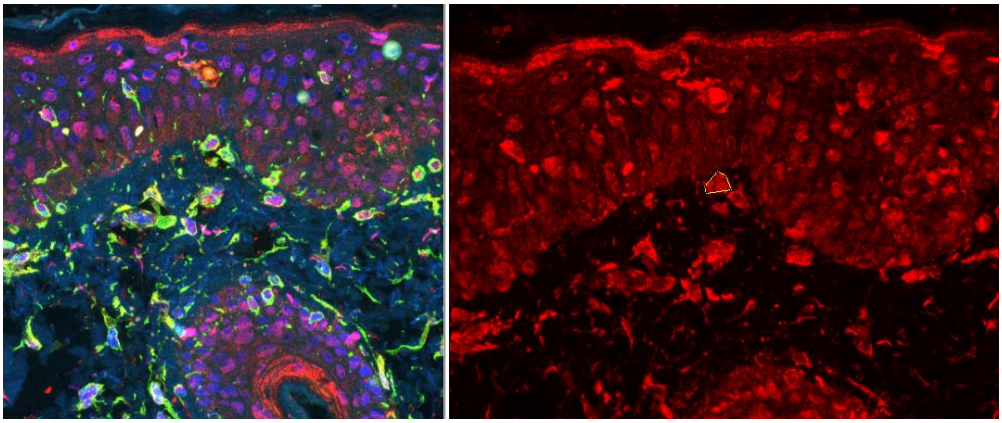
- Localizar os melanócitos da camada basal na foto sobreposta (células basais com morfologia típica, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar os melanócitos da basal um a um;



- Comando "medir" – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os melanócitos da camada basal representados na foto;
- Cada lâmina foi fotografada três vezes (em regiões diferentes) e cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

c) Avaliação da marcação nos melanócitos em pêndulo

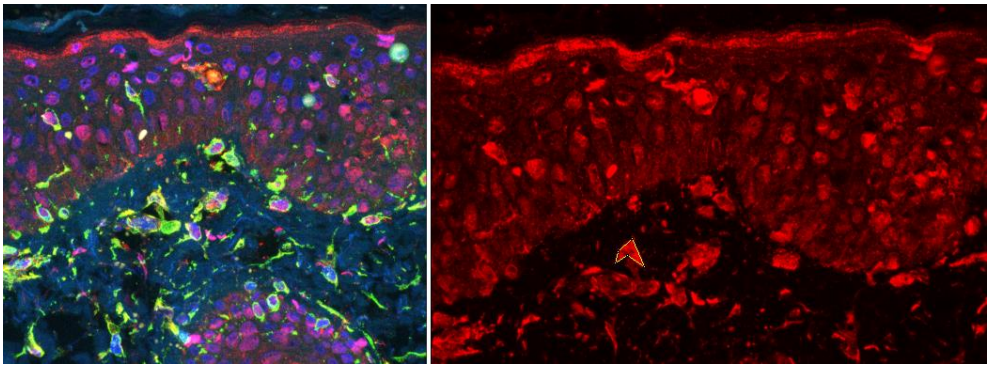
- Abrir arquivo correspondente ao LC3B (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição LC3B, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os melanócitos em pêndulo na foto sobreposta (células da camada basal com morfologia típica que se projetam em direção à derme, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar os melanócitos em pêndulo individualmente;



- Comando “medir” – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os melanócitos em pêndulo representados na foto;
- Cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

d) Avaliação da marcação nos fibroblastos da derme superior

- Abrir arquivo correspondente ao LC3B (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição LC3B, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os fibroblastos da derme superior na foto sobreposta (células estreladas na derme superior, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar as células de interesse individualmente;



- Comando “medir” – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os fibroblastos da derme superior representados na foto;
- Cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

Apêndice 7. Avaliação de p62 através do *software ImageJ*

a) Avaliação da marcação nos queratinócitos epidérmicos

- Abrir o arquivo correspondente ao p62 (marcação em vermelho) no software ImageJ;
- Seleção da camada suprabasal até granulosa (excluindo a córnea devido autofluorescência);
- Comando "medir" – valor da mediana;
- Cada lâmina foi fotografada três vezes (regiões diferentes) e cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

b) Avaliação da marcação nos melanócitos basais

- Abrir o arquivo correspondente ao p62 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição p62, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os melanócitos da camada basal na foto sobreposta (células basais com morfologia típica, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar os melanócitos da basal um a um;
- Comando "medir" – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os melanócitos da camada basal representados na foto;
- Cada lâmina foi fotografada três vezes (em regiões diferentes) e cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

c) Avaliação da marcação nos melanócitos em pêndulo

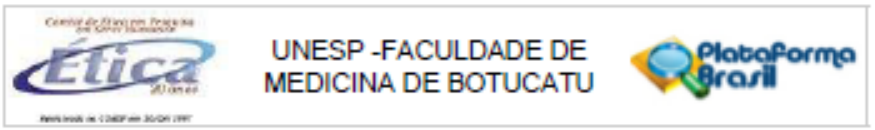
- Abrir arquivo correspondente ao p62 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição p62, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os melanócitos em pêndulo na foto sobreposta (células da camada basal com morfologia típica que se projetam em direção à derme, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar os melanócitos em pêndulo individualmente;
- Comando "medir" – valor da mediana;
- Repetir esta avaliação para todos os melanócitos em pêndulo representados na foto;
- Cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

d) Avaliação da marcação nos fibroblastos da derme superior

- Abrir arquivo correspondente ao p62 (marcação em vermelho) no *software ImageJ*;
- Manter arquivo da sobreposição p62, DAPI e vimentina em paralelo;
- Localizar os fibroblastos da derme superior na foto sobreposta (células estreladas na derme superior, marcadas em verde por vimentina e com núcleo marcado pelo DAPI);
- Selecionar as células de interesse individualmente;
- Comando "medir" – valor da mediana;

- Repetir esta avaliação para todos os fibroblastos da derme superior representados na foto;
- Cada uma das lâminas foi analisada também três vezes.

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da autofagia e da senescência na epiderme e derme superior na pele com melasma em comparação com a pele sã adjacente.

Pesquisador: Ana Cláudia Cavalcante Espósito

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 88076618.9.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.700.672

Apresentação do Projeto:

Após avaliação prévia do projeto, foi solicitada a inclusão de riscos e benefícios do estudo no TCLE.

As informações foram incluídas no TCLE. Os riscos são infecção e marca no local da biópsia. Os benefícios são as contribuições para a compreensão do melasma, doença ainda sem cura.

Objetivo da Pesquisa:

Previamente avaliado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Previamente avaliado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Previamente avaliado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE encontra-se adequado ao estudo.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa apresentado encontra-se APROVADO.

Endereço: Chácara Butignoli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Continuação do Parecer: 2.700.672

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 04 de junho de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1078692.pdf	13/05/2018 16:54:57		Aceito
Outros	cartarespostapendencia.docx	13/05/2018 16:53:33	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	novotermodeconsentimento.doc	13/05/2018 16:52:34	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoetica.doc	20/03/2018 22:57:16	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Orçamento	orcamentodegastos.doc	20/03/2018 22:46:44	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	20/03/2018 22:43:24	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Cronograma	cronogramadeatividades.doc	20/03/2018 22:42:27	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinadafinal.pdf	20/03/2018 22:32:19	Ana Cláudia Cavalcante Espósito	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: Chácara Butignoli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Anexo 2. Produção científica durante o doutorado

- 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):420-424.

- 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.

- Espósito AC, Brianezi G, de Souza NP, Miot LD, Miot HÁ. 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.

- 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.

- Cassiano D, Esposito Lemos AC, Hassun K, Bagatin E, Lima MMDA, Lima EVA, et al. Efficacy and safety of microneedling and oral tranexamic acid in the treatment of facial melasma in women: an open, evaluator-blinded, randomized clinical trial. J Am Acad Dermatol. 2020 (ahead of print). DOI: 10.1016/j.jaad.2020.02.002.

- Nii D, Espósito ACC, Schimitt JV, Peres G, Miot HA. Características da aplicação de filtro solar na face por brasileiros previamente diagnosticados com câncer da pele. Surg Cosmet Dermatol. 2020;12(1):67-69.

- Olivatti TOF, Alcantara GP, Lemos ACCE, da Silva MG, Miot HA. Standardization of organoid culture for evaluation of melanogenesis induced by UVB, UVA and visible light. An Bras Dermatol. 2020;95(1):46-51.

- Alcantara GP, Olivatti TOF, Lemos ACCE, da Silva MG, Miot HA. Avaliação da resposta melanogênica *ex vivo* às radiações UVB, UVA e luz visível no melasma facial e pele adjacente não afetada. An Bras Dermatol. 2020; (ahead of print).

- Nii D, Espósito ACC, Schimitt JV, Peres G, Miot HA. Tinted sunscreens lead to a smaller amount of the product applied on the face. Int J Dermatol. 2020; (ahead of print).

- Espósito ACC, de Souza NP, Miot LDB, Miot HA. Expressão de OPN3 em

fibroblastos, melanócitos e queratinócitos da pele com melasma facial em comparação com a pele adjacente não afetada. An Bras Dermatol. 2020; (*ahead of print*).

- Lima PB, Dias JA, Esposito AC, Cassiano DP, Miot LDB, Bagatin E, Miot HA. A comparative study of topical 5% cysteamine versus 4% hydroquinone in the treatment of facial melasma in women. Int J Dermatol. 2020 (ahead of print). DOI:10.1111/ijd.15146.

- Lima PB, Dias JA, Esposito AC, Miot LDB, Miot HA. French maritime pine bark extract (pycnogenol) in association with triple combination cream for the treatment of facial melasma in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. J Eur Acad Dermatol Vener. 2020 (ahead of print). DOI:10.1111/jdv.16896