



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

**Gabrielli Brianezi**

**Avaliação da atividade da unidade epidermo-  
melânica e do dano dérmico no melasma**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot  
Co-orientadora: Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

**Botucatu  
2016**

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

**Avaliação da atividade da unidade epidermo-melânica e do  
dano dérmico no melasma**

Doutoranda: Gabrielli Brianezi  
Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot  
Co-orientadora: Profa. Dra. Mariângela E. A. Marques

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

Botucatu  
2016

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

Brianezi, Gabrielli.

Avaliação da atividade da unidade epidermo-melânica e do dano dérmico no melasma / Gabrielli Brianezi. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Hélio Amante Miot

Coorientador: Mariângela Ester Alencar Marques

Capes: 40105008

1. Melanose. 2. Cor da pele. 3. Distúrbios de pigmentação da pele. 4. alfa-MSH. 5. MSH (Hormônio). 6. Radiação ultravioleta.

Palavras-chave:  $\alpha$ -MSH; Melasma; Pigmentação da pele; Raios ultravioleta; Transtornos de pigmentação.

## Sumário

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTO ESPECIAL .....	6
AGRADECIMENTOS.....	7
Lista de abreviaturas / Siglas .....	9
Resumo .....	11
Abstract.....	12
1. Revisão de literatura.....	13
2. Objetivos .....	25
3. Primeiro manuscrito.....	26
4. Segundo manuscrito.....	30
5. Terceiro manuscrito.....	40
6. Conclusões .....	53
7. Perspectivas.....	54
8. Anexos.....	57
8.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	57
8.2. Anexo 2: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa .....	58
8.3. Anexo 3: Macro para automatização da análise de intensidade da fluorescência (ImageJ).....	59
8.4. Anexo 4: Macro para automatização da análise fractal do colágeno (ImageJ).....	60

## DEDICATÓRIA

### A minha família

Aos meus pais, Sandoval e Marina

Por estarem sempre presentes em minha vida, pelo exemplo e amor que expressam a todo momento.

Ao meu namorado, Mário Felipe

Por todos esses anos juntos, pelo carinho, amizade e amor dedicados, e por cada momento que passamos juntos e por tantos outros que ainda virão.

Aos meus irmãos, Aislan e Danielli e aos meus cunhados Rodrigo e Karen

Pela companhia, carinho e amor. Pela convivência e por todos os momentos passados juntos.

À minha pequena sobrinha Larissa,

Que acaba de entrar na família e eu já amo muito.

À minha cachorra Nina,

Pela companhia de cada dia, e pelo amor incondicional demonstrado a cada volta para a casa.

*A verdadeira felicidade está na própria casa,  
entre as alegrias da família.*

*Liev Tolstói*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A Deus,

Pelas graças e benções derramadas em minha vida e por ser sempre meu alicerce.  
Por me guiar no caminho para alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador, Hélio Amante Miot,

Pelo pesquisador dedicado, pela atenção e ensinamentos que levarei por toda minha vida profissional, pelo incentivo diário para que não desanimasse até o fim deste trabalho.

Ao Prof. João Lauro,

Pela disponibilidade em ajudar e ensinar a todo momento e permitir que fizessem parte do TOXICAM, é um exemplo de dedicação e professor.

À ProfªDrªZalfa Abdel-Malek,

Pelo acolhimento em sua casa e laboratório, pela disposição de ensinar. Obrigada pelos oito meses de convívio e trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pacientes,

Que se doaram para a realização deste trabalho, e a confiança que depositaram em mim.

À Dra. Luciane DonidaBartoli Miot,

Pelo recrutamento dos pacientes e coleta das amostras.

Aos meus avós, Benedito e Zoraide

Pelas orações, companhia e carinho por todos esses anos.

Aos meus avós, Adelelmo (*in memoriam*) e Maria (*in memoriam*)

Por todas as boas lembranças deixadas, e o carinho oferecido.

À minha segunda família, Maria e Francisco (Paco), Thiago, Paulinha, Lays, Ricardo, Luciane, Vinícius e Júlia

Por me acolherem com todo carinho e me aceitarem como parte da família.

À Vicky Shope e RennySterner

Pela paciência e ensinamentos no período em que estive no laboratório, e a disponibilidade de continuar ajudando até hoje.

À Dra. Denise,

Por ceder o espaço de seu laboratório e sala de cultura para o término deste trabalho.

Aos amigos do TOXICAM (Merielen, Lígia, Nathália, Rafaela, Paulo, Osvaldo, Juliana, Viviane, Cristina, Carolina, Iza e Carla)

Pela companhia diária, por todos os trabalhos desenvolvidos juntos, por ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

Aos Amigos Carminha, Aline, Ana Luisa e Bayan

Pelos momentos vividos em Cincinnati, por serem minha família neste período, pela companhia e pela amizade que irá perdurar para sempre.

Às irmãs de coração, Danielle, Fernanda, Débora, Andressa, Fernanda, Eliane e Priscila

Pela amizade e carinho, reforçadas a cada encontro, que apesar de poucos, fundamentais. Amizade que distância alguma é capaz de desfazer.

Aos amigos Bruna, Karen, Renato, Carlos, Mariana, Marina (Perdiz), Michele, Fabiano, Vítor, Luana e Val,

Pela amizade, e por sempre estarem presentes na minha vida.

À secretária Vânia,

Pelo auxílio no desenvolvimento de minha pós-graduação.

**Trabalho desenvolvido no laboratório Núcleo de Avaliação do  
Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana – TOXICAM**

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro de:  
**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –  
FAPESP (2012/05004-1 e 2012/09233-5).**

## Lista de abreviaturas / Siglas

$\alpha$ MSH – hormônio estimulante dos melanócitos do tipo alfa.  
ACTH – hormônio adrenocorticotrófico.  
ALOX15B – gene da 15-lipooxigenase tipo 2.  
bFGF – fator de crescimento básico de fibroblastos.  
cAMP – adenosina monofosfato cíclico.  
CCL2 – gene da quimiocina monocitária.  
CDH11 – gene da caderina 11.  
CDKN2A – gene do inibidor da ciclinaquinase (p16).  
c-kit – receptor do fator de célula tronco.  
COL4A1 e COL7A1 – gene do colágeno tipo IV e VII.  
COX2 – ciclo-oxigenase tipo 2.  
CSF2 – gene do fator estimulador de colônia.  
DAB – diaminobenzidina.  
DGAT2L3 – gene da acil-coa álcool aciltransferase tipo 1.  
DKK1, 3 – dickkopf 1 e 3.  
EDN1, 3 – genes da endotelina 1 e 3.  
ESR1 – receptor de estrógeno alfa.  
ESR2 – receptor de estrógeno beta.  
ET-1 – endotelina-1.  
GLB1 – gene da  $\beta$ -galactosidase.  
HE – hematoxilina e eosina.  
HGF – fator de crescimento hepático.  
IGF2 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2.  
IL-17 – interleucina 17.  
IL-1A, B – interleucina-1 alfa e beta.  
IL-6 – interleucina 6.  
iNOS – óxido nítrico sintetase induzível.  
KITLG – gene do fator de célula tronco, KIT ligante.  
LH – hormônio luteinizante.  
MAPK14 – gene da proteína quinase 14.  
MC1R – receptor de melanocortina do tipo 1.  
MIF – gene do fator de transcrição associado à microftalmia.  
MITF – fator de transcrição associado à microftalmia.  
MMP1, 2, 3, 9 – metaloproteinases 1, 2, 3 e 9.  
NF- $\kappa$ B – Fator nuclear  $\kappa$ B.  
NGF – fator de crescimento nervoso.  
NO – óxido nítrico.  
NRG1 – gene da neuregulina 1.  
OXR1 – gene da proteína de resistência a oxidação.  
OXSR1 – gene da proteína de estresse oxidativo.  
PAS – ácido periódico de Schiff.  
PgE<sub>2</sub> – prostaglandina E2.  
POMC – proopiomelanocortina.  
PPARGC1A – gene do coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama.  
PPAR $\alpha$  – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo alfa.  
PTGS2 – gene da ciclooxigenase 2.  
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro.  
RNAmi – micro RNA.  
RUV – radiação ultravioleta.  
SA- $\beta$ -gal –  $\beta$ galactosidase associada à senescência.  
SCF – fator de célula tronco.  
SFRP2 – gene da proteína relacionada com frizzled-2 (via WNT).

siRNA – RNA de interferência.  
SNP – polimorfismo de nucleotídeo único.  
SOD1 – gene da superóxido dismutase solúvel.  
SOD2 – gene da superóxido dismutase mitocondrial.  
TIMP1, 2, 3 e 4 – gene da proteína inibidora de MMPs.  
TP53 – gene da proteína tumoral p53.  
TYR – tirosinase.  
TYRP1 e 2 – proteína relacionada à tirosinase 1 e 2.  
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular.  
VEGFA – gene do VEGF.  
WIF-1 – fator inibidor da via WNT tipo 1.  
Wnt – via WNT/ $\beta$ Catenina.  
Wnt3a e 5a – fatores estimuladores da via WNT.

## Resumo

A patogênese do melasma, especialmente o papel dos queratinócitos e fibroblastos no desenvolvimento e manutenção da doença não é bem compreendida. Alterações dérmicas como dano estrutural à zona de membrana basal, melanócitos em pêndulo, elastose solar, celularidade, proliferação vascular, além da expressão de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento, expressão epitelial de melanocortina e receptores dos hormônios sexuais; sugerem interação entre a unidade epidermo-melânica e a derme na fisiopatologia do melasma. A pigmentação melânica da pele pode ser estimulada por diferentes vias de sinalização, sendo a radiação ultravioleta, citocinas dérmicas e inflamação epidérmica, os modelos mais usuais. Neste estudo, objetivamos comparar a morfologia nuclear e a textura da cromatina entre queratinócitos basais no melasma facial e pele adjacente, investigar a ativação das diferentes vias de estímulo à pigmentação, além do envolvimento da derme, com foco na zona de membrana basal e colágeno, no melasma facial. Para a sua execução, foram coletados pares de biópsias faciais (2mm) de mulheres adultas com melasma e de pele adjacente (<2 cm). Processaram-se para coloração de PAS e picosirius red; imunofluorescência para p53, p38, IL-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ MSH, MC1R e COX2; imunistoquímica para Melan-Acontracorada com PAS; Microscopia Eletrônica de Transmissão, além de cultura primária de fibroblastos para real-timePCR array e marcação para SA- $\beta$ -gal. Foram avaliados: núcleos de queratinócitos da camada basal quanto à morfometria nuclear e textura da cromatina; quantificada a intensidade de fluorescência nos compartimentos da epiderme e derme; avaliadas organelas citoplasmáticas e zona de membrana basal; além do colágeno dérmico e densidade de melanócitos: totais e em pêndulo. Em relação à pele adjacente sem melasma: núcleos de queratinócitos basais da epiderme com melasma facial apresentaram índices morfométricos e textura da cromatina alterados; houve aumento da expressão epitelial de  $\alpha$ MSH e MC1R, sem diferença quanto ao p53, p38, IL1 $\alpha$  e COX2; houve maior número de organelas citoplasmáticas e melanossomas em estágios de maturação maiores nos queratinócitos e melanócitos; áreas danificadas na zona de membrana basal com presença de microvesículas adjacentes à membrana basal; maior número de melanócitos em pêndulo; colágeno dérmico desestruturado. Entre os fibroblastos, houve maior marcação para SA- $\beta$ -gal e expressão alterada dos genes COL4A1, IL6, ESR2, DKK3, CCL2, WIF1, WNT3A, HGF, IL1B, MMPs 1-7-9 no melasma. As alterações encontradas nos queratinócitos, na derme e zona de membrana basal, sugerem que o fenótipo do melasma pode resultar de alterações em toda unidade epidermo-melânica, não somente de uma hipertrofia dos melanócitos, as vias inflamatórias da epiderme e dependentes de p53 não se mostraram proeminentes, além de ser identificado um possível papel do processo de reparo/dano da derme e da senescência de fibroblastos na patogênese da doença.

**Palavras-chave:** Anticoncepcionais, Estudos Transversais, Gravidez, Melasma, Pigmentação da pele, Transtornos de pigmentação, Raios Ultravioleta, Melanossomas, Imunoistoquímica, Imunofluorescência, p53, Microscopia Eletrônica,  $\alpha$ -MSH, COX-2, p38, IL-1.

## Abstract

The melasma pathogenesis, specially the role of keratinocytes and fibroblast in the disease development and maintenance are not completely understood. Dermal alterations such as basal membrane structural damage, pendulous melanocytes, solar elastosis, cellularity, vascular proliferation, in addition to the expression of inflammatory mediators, grow factors, epithelial melanocortin and sexual hormones receptors, suggest there is an interaction between the epidermal melanin unit and dermis in melasma physiopathology. The melanin skin pigmentation can be stimulated by different signaling pathways. UVR, dermal cytokines and epidermal inflammation are the most common models. These study aims to compare the nuclear morphology and chromatin texture in basal keratinocytes between melasma and adjacent skin, to investigate the activation of different pigmentation signaling pathways, and the dermal involvement, focusing on basal membrane zone and collagen. Therefore, facial skin biopsies (2 mm) from women were taken from melasma and normal skin (<2 cm apart) and processed for PAS and picosirius red; immunofluorescence for p53, p38, IL-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ MSH, MC1R and COX2, immunohistochemistry for Melan-A counterstaining with PAS, and transmission electronic microscopy. Furthermore, primary fibroblast culture for real-timePCRarray and SA- $\beta$ -gal staining. The nuclei of basal keratinocytes were evaluated as nuclear morphometry and chromatin texture; the fluorescence intensity was quantified in the epidermis and dermis; cytoplasm organelles and basal membrane zone were evaluated; in addition to dermal collagen and melanocytes density: total and pendulous. Regarding adjacent healthy skin, the melasma skin showed alterations in morphometric index and chromatin texture; there was greater epithelial expression of  $\alpha$ MSH and MC1R, but without difference for p53, p38, IL1 $\alpha$  and COX2; cytoplasm organelles and melanossomas in higher maturity were in greater number in keratinocytes and melanocytes; there were commoner damaged areas in basal membrane zone, presence of microvesicules adjacent to basal membrane; and higher number of pendulous melanocyte; dermal collagen was less structured. There were greater SA- $\beta$ -gal staining and altered expression of COL4A1, IL6, ESR2, DKK3, CCL2, WIF1, WNT3A, HGF, IL1B, MMPs 1-7-9 genes in melasma fibroblasts. The alterations presented in keratinocytes, dermis and basal membrane zone suggest the melasma phenotype can result from alteration in entire epidermal melanin unit, not just hypertrophic melanocytes, the epidermal inflammatory pathways and p53 dependents do not show prominence, in addition to the possible role of the repair/ damage process identified at dermis and fibroblast senescence in the melasma pathogenesis.

**Keywords:** Contraceptives, Cross-Sectional Studies, Pregnancy, Melanoma, Skin Pigmentation, Pigmentation Disorders, Ultraviolet Rays, Melanosomes, Immunohistochemistry, Immunofluorescence, p53, Electron Microscopy,  $\alpha$ -MSH, Cox-2, p38, IL-1.

## 1. Revisão de literatura

Melasma é uma alteração da melanogênese cutânea, crônica, adquirida, caracterizada por hiperpigmentação localizada de regiões da pele expostas ao sol, principalmente face, fronte e têmporas. Apresenta-se como manchas acastanhadas simétricas, de bordas irregulares, porém, com limites bem definidos (Figura 1) (1, 2).



**Figura 1.** Melasma facial. Áreas de hiperpigmentação frontal, temporal, zigomática e parotídea. Fonte: arquivo do autor.

É mais frequente entre mulheres adultas, em idades de 30 a 55 anos, sendo os homens acometidos somente em 5-10% dos casos, com importante redução da prevalência após a menopausa, ou na sexta década. Embora acometa todas as etnias, há maior incidência da doença em fenótipos mais pigmentados, sendo mais comum em mulheres de origem oriental e hispânica que habitam a região dos trópicos, onde ocorre uma maior exposição à radiação ultravioleta (RUV) (3-7).

Não há consenso entre os autores quanto à classificação clínica do melasma, comumente é dividido em três padrões de acometimento da face: centrofacial, malar e

mandibular, entretanto, formas mistas são bastante comuns (35-45%) (1, 5).

Formas extrafaciais (p. ex.: colo, membros superiores e cervical) costumam se desenvolver mais tardiamente e podem estar associadas à terapia de reposição hormonal, porém, não há elementos que sugiram diferente fisiopatogênese desse subtipo em relação ao melasma facial (8).

Muitos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do melasma, como a exposição crônica à RUV, gravidez, contraceptivos orais e outros esteroides, tumores ovarianos, terapia de reposição hormonal, cosméticos, drogas fotossensíveis, inflamação e estresse (9-12).

Outro elemento importante associado a sua gênese é a predisposição genética, alguns estudos apontam alta incidência familiar (40-60%), o que sugere que o melasma dependa da interação do ambiente com a susceptibilidade genética, constituindo uma doença multifatorial (5, 13).

Outros elementos foram identificados por estudos observacionais: associação com doença tireoidiana, aumento do LH, ansiedade, ancestralidade genética, estresse oxidativo e uso de antidepressivos, que devem ser explorados posteriormente em estudos controlados e amostras representativas (2, 4, 6, 13-15).

A exposição à RUV compreende o principal fator de risco conhecido que leva ao desenvolvimento e agravamento da doença. Há maior exacerbação da doença no verão, e uma diminuição das manchas no inverno (1, 16). Pacientes com melasma referem com maior frequência a moradia no litoral ou no interior, o que pode aludir à maior exposição solar crônica na infância e juventude como fator de risco, apesar disso, queimaduras solares não foram mais prevalentes neste grupo (13). Finalmente, o uso regular de filtro solar diminui a gravidade da doença em até 50 % nos ensaios clínicos, e pode reduzir sua incidência na gravidez em mais de 90 % (17, 18).

Caracteristicamente, o melasma se comporta como doença crônica, recidivante, apesar dos tratamentos. Essa característica da sua história natural, associado ao acometimento de áreas expostas, principalmente em mulheres durante o período fértil, inflige grande comprometimento à qualidade de vida dos pacientes (19-21).

Melasma é muito frequente na população brasileira, estima-se que entre 15 e 30% das mulheres adultas sejam acometidas, o que causa grande procura ao atendimento dermatológico. Apesar de ser uma alteração benigna da pigmentação, influencia a qualidade de vida devido à sua natureza esteticamente desfigurante, o que causa efeitos emocionais e psicológicos acarretando problemas no convívio social e até relatos de suicídio (11, 22-26).

A melanogênese é um processo complexo que se desenvolveu em humanos devido a

várias pressões seletivas e pode ser induzido por diferentes estímulos, sendo a RUV o principal deles, entretanto, diversas doenças promovem hiperpigmentação melânica por diferentes mecanismos, como a hiperpigmentação pós-inflamatória, eritema *ab igne*, urticária pigmentosa, nevus melanocíticos, lentigos solares, efélides, ocronose e fitofotodermatite (6, 27-30). Há, porém, evidências que o melasma constitua uma hiperpigmentação melânica de características independentes das demais dermatoses pigmentares, cujo processo ainda não foi completamente elucidado, mas provavelmente, vai levar à idealização de tratamentos mais eficientes (31, 32).

No melasma a produção de melanina está aumentada em quantidade e qualidade, devido à hiperprodução de melanossomas mais maduros, usualmente vistos em peles mais pigmentadas, como os africanos. Ocorre distribuição mais efetiva dos melanossomas para os queratinócitos e menor degradação epitelial (2, 32, 33).

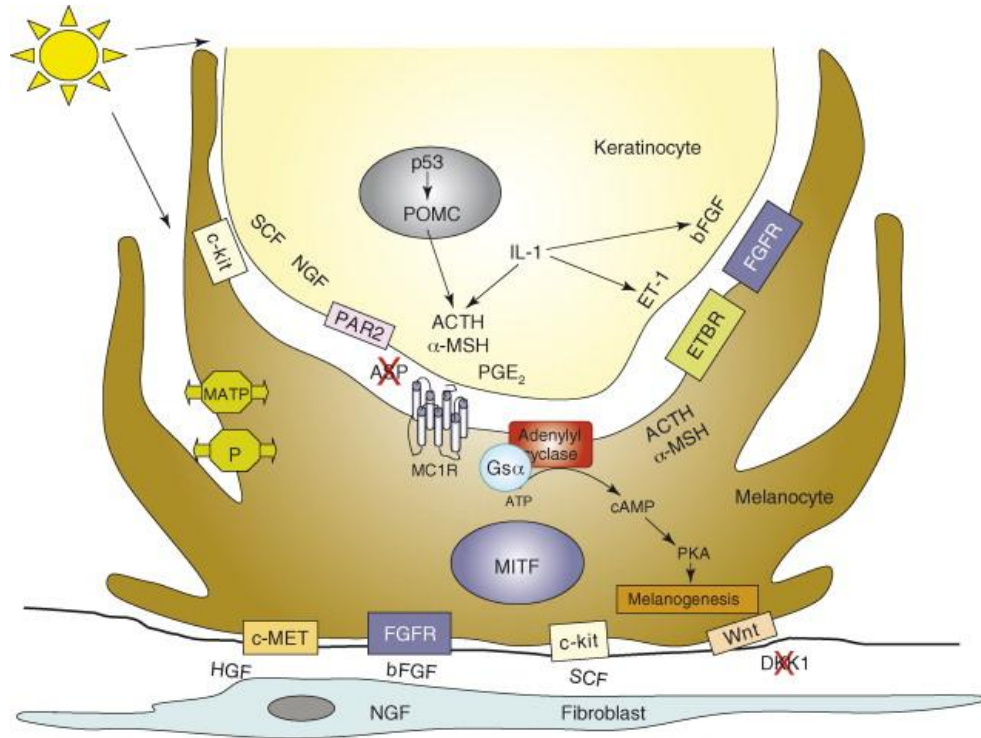
A presença proeminente de melanina na derme com melasma é matéria de discussão entre os pesquisadores, já que estudos recentes demonstram não haver diferença entre melasma e pele sã adjacente, desabonando a classificação do melasma como epidérmico e dérmico (4, 25).

O melanócito se constitui como uma célula especializada na síntese e transporte de melanina, e se distribui por todo o tegumento, com alta concentração na face. Diferentes estímulos levam a sua ativação e interferência com os padrões de melanogênese (Figura 2).

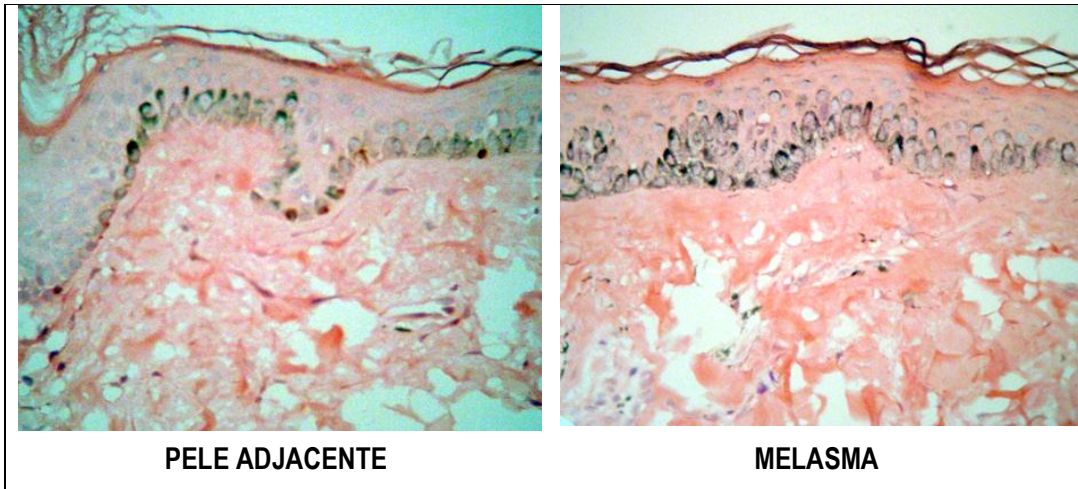
O estímulo baseado em RUV induz a expressão de p53 nos queratinócitos que promovem a síntese de proopiomelanocortinas, entre elas o  $\alpha$ -MSH que se ligam aos receptores (MC1R) e promovem a síntese da tirosinase a partir da ativação do MITF. Em paralelo, fibroblastos secretam *stem cell factor* que se ligam aos receptores c-kit dos melanócitos levando ao mesmo processo (31, 32, 34).

Estímulos inflamatórios cursam com secreção de endotelina e IL-1 que induzem a melanogênese, da mesma forma que estímulos de reparo como os induzidos por bFGF, HGF e a ativação da via Wnt. Também ocorre expressão de  $\alpha$ MSH nos queratinócitos, independentemente da exposição à RUV, em resposta ao aumento da secreção de PgE<sub>2</sub> epitelial, induzida por COX2 (35).

Todos esses elementos foram imputados como envolvidos na patogênese do melasma, e serão discutidos adiante, evidenciando que ocorra um padrão individual de pigmentação envolvendo diferentes vias.

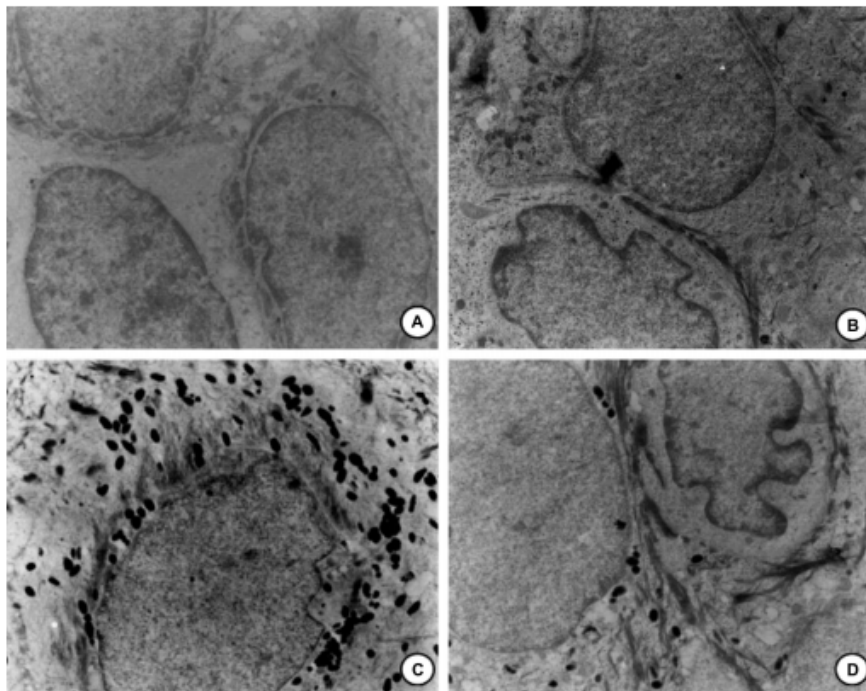


**Figura 2.** Representação esquemática da interação entre um queratinócito e fibroblasto com melanócito demonstrando diferentes estímulos que podem induzir melanogênese. Fonte: (36).



**Figura 3.** Cortes histológicos de melasma e pele são adjacente facial. Hiperpigmentação de todas as camadas epidérmicas, proeminente no melasma (Fontana-Masson, 40x). Fonte: arquivo do autor.

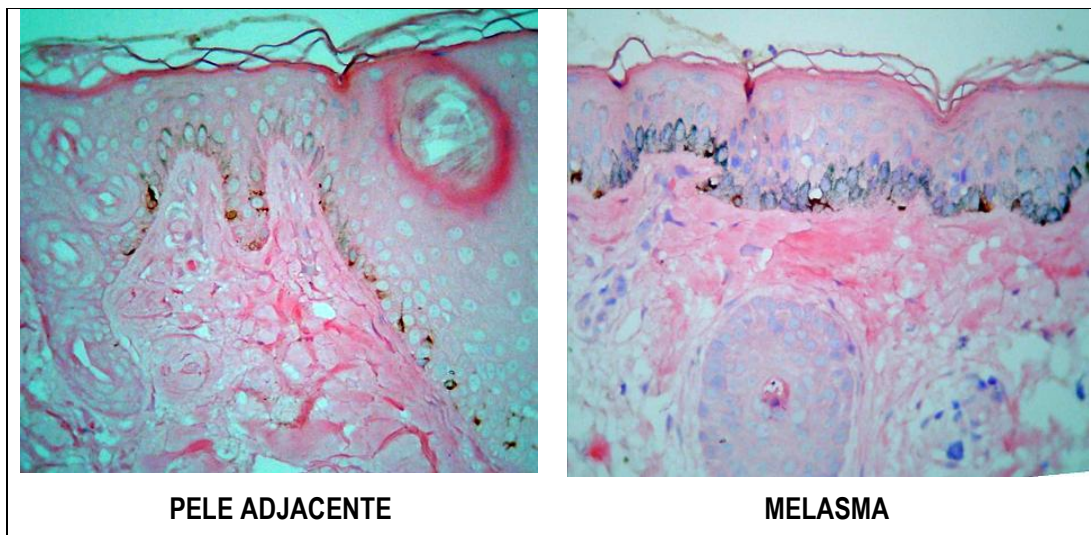
Histologicamente, a pele lesionada com melasma é diferente da pele normal. Estudos mostraram que a pele lesionada possui maior quantidade de melanina em todas as camadas epidérmicas, principalmente na camada basal (Figura 3). Também se observou uma maior quantidade de melanossomos (maduros) em estágio IV (Figura 4) (37-39).



**Figura 4.** Microscopia eletrônica do melasma e pele sã adjacente facial. Queratinócitos do melasma (C) com melanossomas mais numerosos e mais maduros que a pele adjacente (A). Melanócitos do melasma (D) com organelas mais proeminentes que melanócitos da pele adjacente (B). Fonte: (39)

Os melanócitos estão hipertrofiados com dendritos mais proeminentes, contudo, quanto ao número de melanócitos, há uma controvérsia relacionada ao seu aumento na pele lesada. Alguns estudos apontam esse aumento, porém utilizam pele controle (não lesada) de região não adjacente à lesão, e também técnicas poucos específicas para detecção de melanócitos (1). A maior parte dos estudos recentes mostram o número de melanócitos na pele com melasma semelhante à pele adjacente sem lesão (Figura 5), porém, com hiperatividade funcional. Evidencia-se um número maior de dendritos, aumento no tamanho da célula, maior síntese de melanina, com maior transferência de melanossomas para os queratinócitos e também diminuição de degradação dos melanossomas (4, 39).

Foram observadas, também, alterações fenotípicas nos queratinócitos como mudanças na cromatina e morfometria nuclear. Esses achados sugerem que o processo fisiopatológico do melasma envolva toda a unidade epidermo-melânica, e não decorra somente de alteração focal do melanócito (40).



**Figura 5.** Cortes histológicos de melasma e pele sã adjacente facial. Melanócitos uniformemente distribuídos na camada basal (Melan-A / Giemsa, 40x). Fonte: arquivo do autor.

Há vários fatores de crescimento liberados pelos queratinócitos que estão aumentados no epitélio com melasma comparado à pele adjacente, como expressão de NGF, *stem cell factor*,  $\alpha$ MSH, e seus receptores. Apesar do papel do óxido nítrico (NO) ainda permanecer desconhecido na pigmentação, foi também encontrado aumento da expressão de NO sintetase no melasma (25, 41, 42).

Muitos estudos de exploração genômica no melasma identificaram alterações dos perfis de expressão. Um estudo com 279 genes mostrou que havia maiores níveis de RNA de proteínas relacionadas a melanogênese como mRNA TYRP1 (43).

Alguns genes relacionados aos queratinócitos também estavam alterados no melasma, como o H19, um gene não codificante que está em *imprint* com o gene *insulin-like growth factor type II* (IGF2), e tem expressão diminuída no melasma (44).

Estudos *in vitro* com cocultura (queratinócitos e melanócitos) demonstrou que a diminuição da expressão do H19 induz a melanogênese e a transferência de melanossomas para os queratinócitos, porém, o H19 não foi detectado em monocultura de melanócitos (44), o que fortalece a evidência de participação dos queratinócitos na rede de comunicação celular envolvida na patogênese da doença.

Ainda nesse estudo, foi observado um aumento adicional na expressão de tirosinase, quando coculturas de queratinócitos *knockdown* para o gene H19 e melanócitos, foram tratadas com estrogênio, sugerindo uma via de envolvimento hormonal no melasma (43, 44).

Além da evidência epidemiológica de prevalecer em mulheres em idade fértil, aumentar a incidência durante a gestação e em terapias hormonais como os contraceptivos

orais, outros estudos apontam o envolvimento dos estrogênios no melasma. Esta associação também foi observada com o gene PDZK1, que estimula a transcrição da tirosinase. Sua expressão foi induzida pelo estrógeno e mostrou-se alterada em pacientes com melasma (45).

A pele normalmente possui receptores de estrógeno e de progesterona, contudo, os resultados sobre a ação dos hormônios sobre a pigmentação ainda são conflitantes, principalmente relacionados à progesterona (46, 47).

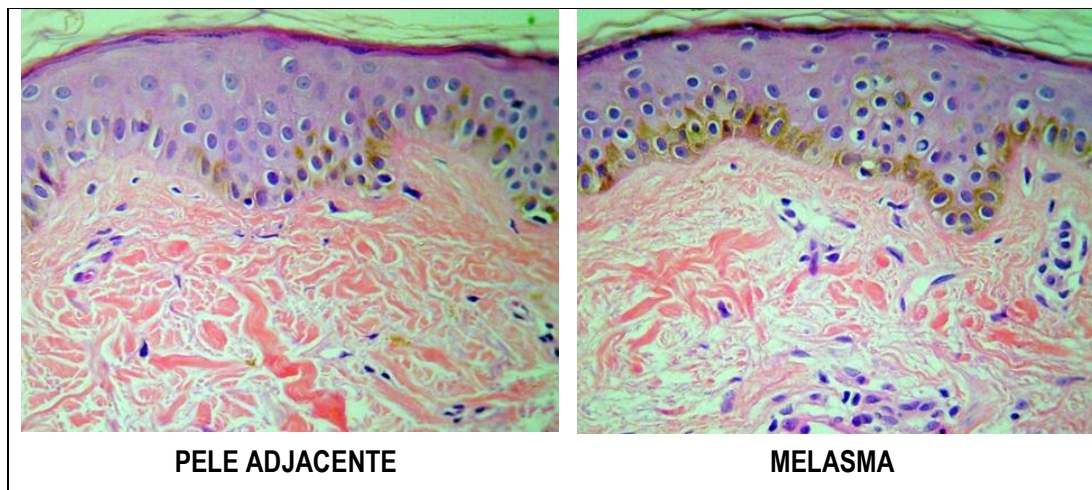
No melasma, receptor de progesterona e de estrógeno são aumentados no epitélio (48, 49). *In vitro*, estrógeno induz a síntese de enzimas melanogênicas em melanócitos como TYRP-1, TYRP-2 e MITF, mas as vias de ação dos esteroides sexuais na doença ainda não são completamente conhecidas (45, 50).

Outros genes que agem como moduladores da via do Wnt, como o WIF1, SFRP2 e o Wnt5a estão superexpressos no melasma. Por outro lado, genes relacionados com o metabolismo dos lipídeos como PPAR $\alpha$ , ALOX15B, PPARGC1A e DGAT2L3 estavam com a expressão diminuída na pele lesionada. Essa diminuição da expressão desses genes foi subsequentemente confirmada com o estudo de função e reparo da barreira da pele (43, 51), sugerindo que na pele com melasma ocorra dano tecidual e déficit de reparo.

Além disso, foi descrito a presença de melanócitos projetando-se para a derme na pele com melasma, chamados de melanócitos em pêndulo. Conjuntamente, evidenciaram-se alterações na zona de membrana basal, com diminuição da quantidade e densidade de colágeno IV abaixo desses melanócitos pendulares, e aumento de metaloproteinases na derme (52, 53).

Outra alteração na derme superior é a presença de elastose solar proeminente na pele lesada, em comparação com a normal adjacente (Figura 6).

A degeneração elastótica do colágeno é um marcador de fotoexposição crônica e atividade das metaloproteinases da derme superior. Os elementos oxidativos e a ativação de colagenases que levam à elastose podem ser um fator influenciador da hiperpigmentação, embora possa ser somente um fenômeno secundário à exposição solar (54, 55). Há, de forma geral, maiores indícios dano em analogia ao fotoenvelhecimento na pele com melasma que na pele sã adjacente (2, 25).



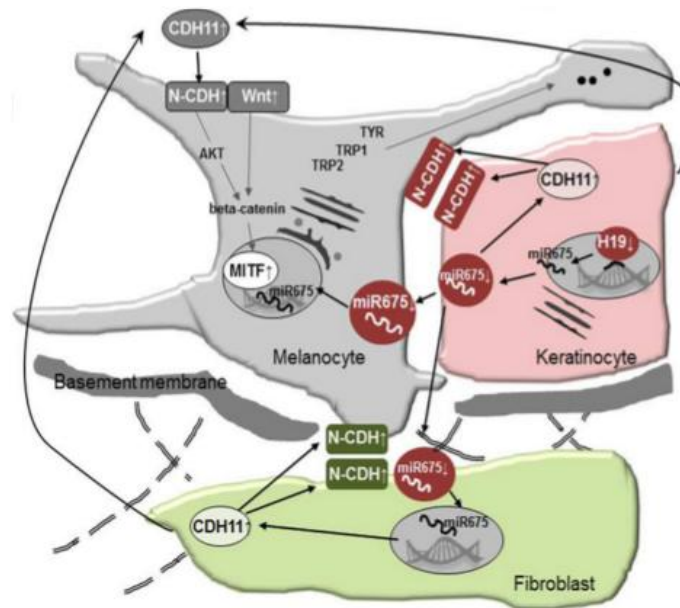
**Figura 6.** Cortes histológicos de melasma e pele sã adjacente facial. Degeneração elastótica do colágeno da derme superior, proliferação endotelial, fragmentação do colágeno e maior celularidade dérmica (HE, 40x). Fonte: arquivo do autor.

Ainda na derme, há maior quantidade de mastócitos, linfócitos CD4<sup>+</sup>, macrófagos CD68<sup>+</sup>, maior atividade de metaloproteinases (MMP1, MMP2, MMP3, MMP9), aumento nos níveis de COX2, NF- $\kappa$ B e IL-17 e aumento da microvasculatura (Figura 6) e expressão de VEGF (56, 57). Esses elementos levam a um microambiente oxidativo e inflamatório que pode manter o tônus pigmentarmelanogênico.

Em fibroblastos dérmicos, foram observados aumento do *stem cell factor* (SCF) e seu receptor c-kit na epiderme, que poder ser induzido pela RUV (58). Contudo, há poucos dados referentes ao papel dos fibroblastos e componentes da derme superior no melasma.

Outro potencial ponto de estudo que pode interferir no melasma, é a ação de microRNAs (miRNA), que são RNAs pequenos, 20-24 nucleotídeos, que desempenham seu papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica. No melasma, o miR-675, um microRNA derivado do RNA do H19, apresenta-se diminuído, e sua expressão interfere com a síntese das enzimas da melanogênese: tirosinase, TRP-1 e TRP-2 (59).

Embora o gene H19 somente se expresse em queratinócitos, há evidências que essas células liberem exossomos contendo miR-675 no espaço extracelular, significando uma comunicação entre queratinócitos e melanócitos (60). O possível papel da diminuição do miR-675 no melasma pode ocorrer pela regulação de MITF e também na expressão caderina 11 (CDH11) que está aumentada no melasma (Figura 7) (61).



**Figura 7.** Modelo fisiopatológico do melasma. Interação de queratinócitos e fibroblastos com a participação do miR-675 e CDH11 induzindo a hiperatividade do melanócito. Fonte: (61).

O melasma está associado a vários fatores etiológicos bastante distintos e nenhum deles pode ser considerado o único responsável pelo desenvolvimento da doença. Sua patogênese ainda permanece desconhecida, necessitando de maiores estudos para caracterizar os diferentes comportamentos da pele lesada e da adjacente, uma vez que recebem influências similares, a fim de que se possa elaborar um modelo etiopatogênico completo. Nesse ínterim, os tratamentos disponíveis não visam as alterações subjacentes, mas estratégias que levem à redução da síntese de melanina, o que se revela como elemento secundário na doença (62, 63).

Finalmente, no melasma, há alterações em toda a estrutura epidérmica, não decorrendo somente de uma alteração melanocítica. Isto reforça a ideia de que a estrutura envolvida no desenvolvimento do melasma seja toda a unidade epidermo-melânica e derme superior, e tal susceptibilidade tissular deva ocorrer com distribuição de mosaico, com manifestação após estímulo ambiental.

### Referências:

1. Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm MC, Jr. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol.* 1981 Jun;4(6):698-710.
2. Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. [Physiopathology of melasma]. *An Bras Dermatol.* 2009 Nov-Dec;84(6):623-35.
3. Piamphongsant T. Treatment of melasma: a review with personal experience. *Int J Dermatol.* 1998 Dec;37(12):897-903.

4. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, Kim J, Lee KB, Yim H, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol*. 2002 Feb;146(2):228-37.
5. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Feb;27(2):151-6.
6. Handel AC, Miot LD, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*. 2014 Sep-Oct;89(5):771-82.
7. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, Machado Filho CA, Kalil CL, Ayres EL, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol*. 2014 Apr;53(4):440-4.
8. Ritter CG, Fiss DV, Borges da Costa JA, de Carvalho RR, Bauermann G, Cestari TF. Extra-facial melasma: clinical, histopathological, and immunohistochemical case-control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Sep;27(9):1088-94.
9. Im S, Lee ES, Kim W, On W, Kim J, Lee M, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes. *J Korean Med Sci*. 2002 Feb;17(1):58-64.
10. Robins AH. Melanosis after prolonged chlorpromazine therapy. *S Afr Med J*. 1975 Aug 30;49(37):1521-4.
11. Wolf R, Wolf D, Tamir A, Politi Y. Melasma: a mask of stress. *Br J Dermatol*. 1991 Aug;125(2):192-3.
12. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol*. 1995 Dec;131(12):1453-7.
13. Handel AC, Lima PB, Tonolli VM, Miot LD, Miot HA. Risk factors for facial melasma in women: a case-control study. *Br J Dermatol*. 2014 Sep;171(3):588-94.
14. Seckin HY, Kalkan G, Bas Y, Akbas A, Onder Y, Ozyurt H, et al. Oxidative stress status in patients with melasma. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014 Sep;33(3):212-7.
15. Lutfi RJ, Fridmanis M, Misiunas AL, Pafume O, Gonzalez EA, Villemur JA, et al. Association of melasma with thyroid autoimmunity and other thyroidal abnormalities and their relationship to the origin of the melasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985 Jul;61(1):28-31.
16. Guinot C, Cheffai S, Latreille J, Dhaoui MA, Youssef S, Jaber K, et al. Aggravating factors for melasma: a prospective study in 197 Tunisian patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Sep;24(9):1060-9.
17. Lakhdar H, Zouhair K, Khadir K, Essari A, Richard A, Seite S, et al. Evaluation of the effectiveness of a broad-spectrum sunscreen in the prevention of chloasma in pregnant women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007 Jul;21(6):738-42.
18. Miot HA, Miot LD. Re: Topical 10% zinc sulfate solution for treatment of melasma. *Dermatol Surg*. 2009 Dec;35(12):2050-1.
19. Ali R, Aman S, Nadeem M, Kazmi AH. Quality of life in patients of melasma. *J Pak Assoc Dermatol*. 2013;23(2):143-8.
20. Cho TH, Hong SB, Ryou JH, Lee MH. Quality of life in melasma. *Korean J Dermatol*. 2007;45(3):232-6.
21. Freitag FM, Cestari TF, Leopoldo LR, Paludo P, Boza JC. Effect of melasma on quality of life in a sample of women living in southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008 Jun;22(6):655-62.
22. 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 Sep;149(3):572-7.
23. Dominguez AR, Balkrishnan R, Ellzey AR, Pandya AG. Melasma in Latina patients: cross-cultural adaptation and validation of a quality-of-life questionnaire in Spanish language. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Jul;55(1):59-66.
24. Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML, Azulay L, Hassun K, Almeida AR, et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol*. 2006 Dec;156 Suppl 1:13-20.
25. Miot LD, Miot HA, Polettini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol*. 2010 Oct;32(7):676-82.
26. Ishiy PS, Silva LR, Penha MA, Handel AC, Miot HA. Skin diseases reported by workers from UNESP campus at Rubiao Jr, Botucatu-SP (Brazil). *An Bras Dermatol*. 2014 May-Jun;89(3):529-31.
27. Jablonski NG, Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol*. 2000 Jul;39(1):57-106.
28. Rees J. Genes for freckles. *J Invest Dermatol*. 2004 Aug;123(2):414.
29. Rees JL, Harding RM. Understanding the evolution of human pigmentation: recent contributions from population genetics. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 2):846-53.
30. Rees JL, Flanagan N. Pigmentation, melanocortins and red hair. *QJM*. 1999 Mar;92(3):125-31.
31. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis\*. *An Bras Dermatol*. 2013 Jan-Feb;88(1):76-83.
32. Lee A-Y. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatologica Sinica*. 2014;32(4):233-9.
33. Costin GE, Birlea SA. What is the mechanism for melasma that so commonly accompanies human pregnancy? *IUBMB Life*. 2006 Jan;58(1):55-7.
34. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007 Apr;21(4):976-94.

35. Gledhill K, Rhodes LE, Brownrigg M, Haylett AK, Masoodi M, Thody AJ, et al. Prostaglandin-E2 is produced by adult human epidermal melanocytes in response to UVB in a melanogenesis-independent manner. *Pigment cell & melanoma research*. 2010;23(3):394-403.
36. Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(2):e189-e99.
37. Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M, et al. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol*. 1998 Aug;139(2):216-24.
38. Toyoda M, Morohashi M. Morphological alterations of epidermal melanocytes in photoageing: an ultrastructural and cytomorphometric study. *Br J Dermatol*. 1998 Sep;139(3):444-52.
39. Miot LDB, Miot HA, da Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma Morphological and functional comparative study of melanocytes in melasma lesions. *An Bras Dermatol*. 2007;82(6):529-34.
40. Brianezi G, Handel AC, Schmitt JV, Miot LD, Miot HA. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Apr;29(4):809-12.
41. Bak H, Lee HJ, Chang SE, Choi JH, Kim MN, Kim BJ. Increased expression of nerve growth factor receptor and neural endopeptidase in the lesional skin of melasma. *Dermatol Surg*. 2009 Aug;35(8):1244-50.
42. Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol*. 2002 Jan;146(1):165-7.
43. Kang HY, Suzuki I, Lee DJ, Ha J, Reiniche P, Aubert J, et al. Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. *J Invest Dermatol*. 2011 Aug;131(8):1692-700.
44. Kim NH, Lee CH, Lee AY. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Feb;23(1):84-92.
45. Kim NH, Cheong KA, Lee TR, Lee AY. PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in melasma. *J Invest Dermatol*. 2012 Nov;132(11):2622-31.
46. Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol*. 2002 Dec;11(6):487-502.
47. Pelletier G, Ren L. Localization of sex steroid receptors in human skin. *Histol Histopathol*. 2004 Apr;19(2):629-36.
48. Tamega Ade A, Miot HA, Moco NP, Silva MG, Marques ME, Miot LD. Gene and protein expression of oestrogen-beta and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosmet Sci*. 2015 Apr;37(2):222-8.
49. Jang YH, Lee JY, Kang HY, Lee ES, Kim YC. Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Nov;24(11):1312-6.
50. Jian D, Jiang D, Su J, Chen W, Hu X, Kuang Y, et al. Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediated up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells. *Steroids*. 2011 Nov;76(12):1297-304.
51. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Dec;26(12):1533-7.
52. Lee DJ, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Pendulous melanocytes: a characteristic feature of melasma and how it may occur. *Br J Dermatol*. 2012 Mar;166(3):684-6.
53. Shin JH, Kang WH. Two cases of melasma with unusual histopathologic findings. *J Korean Med Sci*. 2006 Apr;21(2):368-70.
54. Torres-Alvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cazares JP, Fuentes-Ahumada C, Oros-Ovalle C, Navarrete-Solis J, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. *Am J Dermatopathol*. 2011 May;33(3):291-5.
55. Hernandez-Barrera R, Torres-Alvarez B, Castanedo-Cazares JP, Oros-Ovalle C, Moncada B. Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol*. 2008 May;33(3):305-8.
56. Kim EH, Kim YC, Lee ES, Kang HY. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci*. 2007 May;46(2):111-6.
57. Rodriguez-Arambula A, Torres-Alvarez B, Cortes-Garcia D, Fuentes-Ahumada C, Castanedo-Cazares JP. CD4, IL-17, and COX-2 Are Associated With Subclinical Inflammation in Malar Melasma. *Am J Dermatopathol*. 2015 Oct;37(10):761-6.
58. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim JY, Lee ES, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol*. 2006 Jun;154(6):1094-9.
59. Kim NH, Choi SH, Kim CH, Lee CH, Lee TR, Lee AY. Reduced MiR-675 in exosome in H19 RNA-related melanogenesis via MITF as a direct target. *J Invest Dermatol*. 2014 Apr;134(4):1075-82.
60. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs

- and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
61. Kim NH, Choi SH, Lee TR, Lee CH, Lee AY. Cadherin 11, a miR-675 target, induces N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in melasma. *J Invest Dermatol.* 2014 Dec;134(12):2967-76.
62. Rodrigues M, Pandya AG. Melasma: clinical diagnosis and management options. *Australas J Dermatol.* 2015 Aug;56(3):151-63.
63. Rajaratnam R, Halpern J, Salim A, Emmett C. Interventions for melasma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(7):CD003583.

## **2. Objetivos**

1. Avaliar comparativamente a morfometria nuclear e características texturais da cromatina de queratinócitos basais no melasma facial.
2. Avaliar comparativamente a ultraestrutura de queratinócitos basais, melanócitos e zona de membrana basal no melasma facial.
3. Avaliar a atividade de diferentes vias de pigmentação no melasma facial.
4. Avaliar comparativamente integridade estrutural da derme superficial no melasma facial.
5. Avaliar a expressão gênica de fatores de crescimento, inflamatórios e de composição da matriz extracelular de fibroblastos de melasma facial.
6. Avaliar marcadores de senescência de fibroblastos no melasma facial.

### 3. Primeiro manuscrito

DOI: 10.1111/jdv.12453 JEADV

#### SHORTREPORT

## Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma

G. Brianezi,<sup>1</sup>A.C. Handel,<sup>2</sup>J.V. Schmitt,<sup>2</sup>L.D.B. Miot,<sup>2</sup>H.A. Miot<sup>2,\*</sup>

1 Departamento de Patologia (TOXICAM), FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil 2 Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil \*Correspondence: H. A. Miot. E-mail: heliomiot@fmb.unesp.br

#### Abstract

**Background** The pathogenesis of melasma and the role of keratinocytes in disease development and maintenance are not completely understood. Dermal abnormalities, the expression of inflammatory mediators, growth factors, epithelial expression of melanocortin and sexual hormones receptors suggest that not only melanocytes, but entire epidermal melanin unit is involved in melasma physiopathology.

**Objectives** To compare nuclear morphological features and chromatin texture between basal keratinocytes in facial melasma and adjacent normal skin.

**Methods** We took facial skin biopsies (2 mm melasma and adjacent normal skin) from women processed for haematoxylin and eosin. Thirty non-overlapping basal keratinocyte nuclei were segmented and descriptors of area, highest diameter, perimeter, circularity, pixel intensity, profilometric index (Ra) and fractal dimension were extracted using ImageJ software.

**Results** Basal keratinocyte nuclei from facial melasma epidermis displayed larger size, irregular shape, hyperpigmentation and chromatin heterogeneity by fractal dimension than perilesional skin.

**Conclusion** Basal keratinocytes from facial melasma display changes in nuclear form and chromatin texture, suggesting that the phenotype differences between melasma and adjacent facial skin can result from complete epidermal melanin unit alterations, not just hypertrophic melanocytes.

Received: 13 December 2013; Accepted: 12 February 2014

**Conflicts of interest** None declared.

**Funding sources** FAPESP. Grants no. 2012/09233-5, 2012/05004-1.

#### Introduction

Melasma is a common discoloration due to increased focal epidermal melanocytic activity. It evolves in sun-exposed sites such as the face, neck and upper limbs mainly in women during reproductive years.<sup>1</sup> Its pathogenesis and the role of keratinocytes in disease development and maintenance are not completely understood.

Ultraviolet exposure, genetic predisposition, photosensitizing medicines and sexual hormones (pregnancy and oral contraceptives) are well-established elements that could influence melasma development.<sup>2</sup>

In comparison to adjacent non-lesional skin, areas with melasma present prominence of epidermal hypermelanization, hypertrophied melanocytes (with greater melanosomes maturation), solar elastosis and increased expression of inflammatory

mediators such as iNOS and endothelin and growth factors such as stem cell factor and nerve growth factor.<sup>3</sup>

High epithelial expression of MC1-R, a-MSH, oestrogen and progesterone receptors suggest that not only melanocytes but also the entire epidermal melanin unit is involved in melasma physiopathology.<sup>4,5</sup>

Nuclear morphometry and chromatin texture changes have been identified in situations where genomic modifications occur, such as in field cancerization and carcinomas with different prognoses.<sup>6-8</sup> In melasma, this could support preliminary investigations of genotype or epigenetic differences in keratinocytes from healthy and injured skin.

This study aimed to explore nuclear changes related to morphometry and chromatin texture in basal keratinocytes from facial melasma and adjacent healthy skin

### Material and methods

The project got the approval from Institutional Review Board on Ethics. Facial skin biopsies (2 mm) from women with no treatment except sunscreen were taken from melasma and normal skin (<2 cm apart) and processed for haematoxylin and eosin at TOXICAM (Unesp). Slides were photographed on an Olympus BX41 microscope with 100x objective, giving 1280 x960 pixel, 24bit color images (tiff files).

Sample size was based on stabilization of standard error of the mean <5% for each variable (data not shown). Thirty non-overlapping basal keratinocyte nuclei were manually selected by the same operator (blinded for the group). The nuclei were automatically segmented and descriptors of area, highest diameter, perimeter, circularity, pixel intensity, profilometric index (Ra) and greyscale fractal dimension (FracLac plugin - <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>) were extracted using ImageJ 1.47 software.<sup>9, 10</sup> Greyscale fractal dimension was calculated through volumetric box-count method (cube counting), using grey value as third dimension (z-axis).

Values for each subject were represented by the median value of nuclei from each site and then compared by the paired t-test. Significance was set as  $P < 0.05$ .

### Results

A total of 840 nuclei from 14 women were evaluated; their mean (SD) age was 41.3 (2.8) years (Fig. 1). Nuclear descriptors are shown in Table 1.

Basal keratinocyte nuclei from facial melasma epidermis displayed larger size, irregular shape, hyperpigmentation and chromatin heterogeneity by fractal dimension.

### Discussion

Morphological alterations in epithelium from melasma, in addition to dermal changes and increased epithelial nuclear receptor expression, support the hypothesis that melasma, in addition to a higher melanization phenotype, exhibits changes across the epidermal melanin unit.

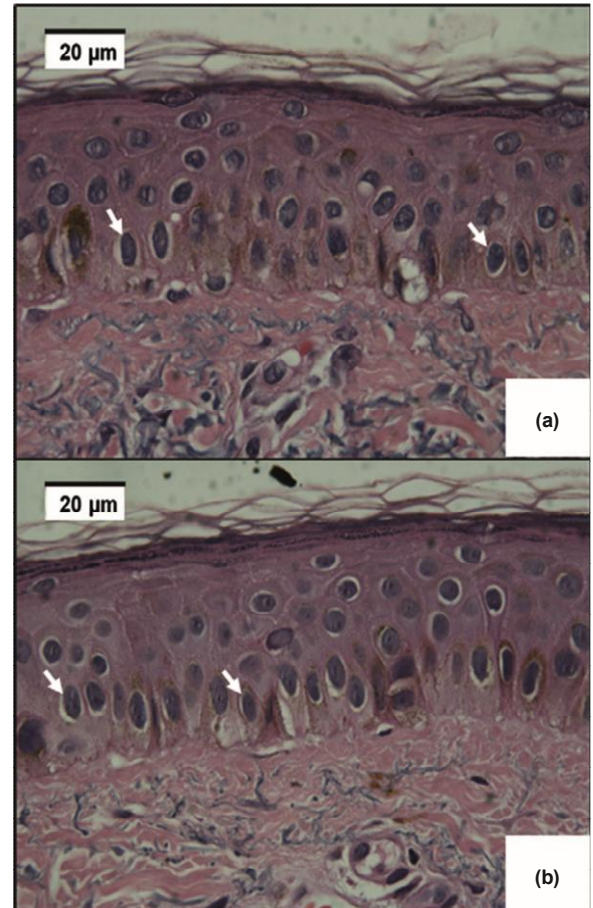


Figure 1 (a) Melasma skin, (b) Perilesional healthy skin. Arrows: individualized basal keratinocyte nuclei (HE 100x), melasma and adjacent healthy skin.

**Table 1** Descriptors of nuclear morphometry and chromatin texture in melasma and adjacent healthy skin.

Variable	Melasma (Mean±SD)	Control (Mean ± sd)	P*
<b>Nuclear shape descriptors</b>			
Larger diameter ( <i>Feret</i> - in $\mu\text{m}$ )	9.26 ± 0.84	8.28 ± 0.85	<0.01
Area (in $\mu\text{m}^2$ )	34.88 ± 5.75	29.22 ± 4.44	<0.01
Perimeter (in $\mu\text{m}$ )	28.11 ± 3.63	24.98 ± 2.66	<0.01
Circularity	0.57 ± 0.07	0.62 ± 0.08	0.03
<b>Chromatin texture descriptors</b>			
Pixel Intensity	57.75 ± 9.44	50.00 ± 11.03	0.05
Ra	130.46 ± 15.18	142.47 ± 16.17	0.07
Fractal dimension	2.33 ± 0.05	2.28 ± 0.03	<0.01

\*paired t-test

Nuclear and chromatin changes are well recognized by pathologists as markers of tissue differentiation (e.g. in malignant neoplasms). Moreover, alterations in chromatin texture and nuclear morphometry can also be found in normal developmental tissues, in ageing and especially if submitted to epigenetic factors and hormonal influence.<sup>10</sup>

Steroid hormones can induce modifications in chromatin structure from breast cell culture, and these alterations occurred in concomitance to functional changes.<sup>11,12</sup> Furthermore, progesterone and  $\beta$ -oestrogen receptors were more expressed in melasma than normal control epithelium.<sup>4,13</sup>

These arguments strengthen the hypothesis that keratinocytes in melasma disclose differences in normal adjacent skin that can be related to disease development.

Keratinocytes are cells that secrete several inflammatory, growth and melanogenic factors.<sup>14</sup> Specific genomic alterations or epigenetic factors (e.g. sexual hormones and ultraviolet radiation) can locally modify their secretion pattern and alter melanocyte physiology.

A study in 2011 comparing 279 genes in disease affected skin and perilesional normal skin, showed epidermal melanin unit hyperactivity in melasma. Skin lesions presented higher levels of melanin and proteins associated with melanogenesis such as mRNA TYRP1 (tyrosinase-related protein 1) expression.<sup>15</sup> Previous studies have also found altered keratinocyte-related genes. The H19 gene was down-expressed in patients with melasma. H19 is a non-coding transcript RNA, but which operates imprinting with the IGF2 gene (insulin-like growth factor type II).<sup>16</sup>

The experimental decrease in H19 transcriptase in mixed keratinocyte–melanocyte cultures induced melanogenesis and melanosome transfer to keratinocytes. In isolated melanocyte culture, this induction was not detected, strengthening the hypothesis of keratinocyte involvement in melasma pathogenesis.<sup>16</sup>

In the same study, treatment with oestrogen in mixed keratinocyte–melanocyte cultures with H19 depleted keratinocytes promoted an

additional effect on tyrosinase expression. This reinforces oestrogen involvement in the pathogenesis of the disease.<sup>15,16</sup>

The association between melasma and gonadal hormones may also be observed with the PDZK1 gene which stimulates tyrosinase transcription. As its expression can be induced by oestrogen and is altered in melasma skin.<sup>17</sup>

Other WNT pathway modulator genes, such as WIF1, SFRP2, and Wnt5a showed higher expression levels in melasma skin. In contrast, lipid metabolism-related genes such as PPAR $\alpha$ , ALOX15B and DGAT2L3 PPARGC1A, were down expressed in lesion skin; this was subsequently confirmed in a study of function and skin barrier repair in melasma.<sup>15,18</sup>

Exogenous carcinogens, such as ultraviolet radiation, can promote specific mutations or locally promote gene regulation which modifies the behaviour of specific tissues inducing a different phenotype, as seen in somatic mosaicism. These modifications can lead to the nuclear alterations that we have demonstrated.

The histological signs of photo damage in melasma skin suggest ultraviolet radiation as the disease promoter. Conversely, the more irradiated areas of the face (e.g. nose and glabella) do not coincide with the highest frequency of melasma sites, leading to the assumption that other factors must be involved in facilitating its development.<sup>19</sup>

The main limitation of the study was its modest sample size; however, this did not hinder the revelation of differences between samples. Conclusions cannot be extrapolated to include males or extrafacial melasma.

These results indicate the need of genomic and epigenetic exploration in isolated primary melanocyte and keratinocyte cultures, looking for the expression of different regulatory factors to highlight independent alterations in melasma and adjacent healthy epithelium.

### Conclusions

Basal keratinocytes from facial melasma display changes in nuclear form and chromatin texture, suggesting that the phenotype differences between melasma and adjacent facial skin can result from complete epidermal melanin unit alterations, not just hypertrophic melanocytes.

## References

1. Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. [Physiopathology of melasma]. *An Bras Dermatol* 2009; 84: 623–635.
2. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1453–1457.
3. Passeron T. Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27(Suppl 1): 5–6.
4. Jang YH, Lee JY, Kang HY, Lee ES, Kim YC. Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 1312–1316.
5. Miot LD, Miot HA, Poletini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol* 2010; 32: 676-682.
6. Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE et al. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1996-2002.
7. Ranger-Moore J, Bartels PH, Bozzo P et al. Karyometric analysis of actinic damage in unexposed and sun-exposed skin and in actinic keratoses in untreated individuals. *Anal Quant CytolHistol* 2004; 26: 155–165.
8. Metze K, Ferreira RC, Adam RL. Classification of thyroid follicular lesions based on nuclear texture features—lesion size matters. *Cytometry A* 2010; 77: 1101-1102.
9. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 2007; 43: 25-30.
10. Metze K. Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13: 719-735.
11. Losa GA, Graber R, Baumann G, Nonnenmacher TF. Effects of steroid hormones on nuclear membrane and membrane-bound heterochromatin from breast cancer cells evaluated by fractal morphometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21: 430–436.
12. Losa GA, Graber R, Baumann G, Nonnenmacher TF. Steroid hormones modify nuclear heterochromatin structure and plasma membrane enzyme of MCF-7 cells. A combined fractal, electron microscopical and enzymatic analysis. *Eur J Histochem* 1998; 42: 21–29.
13. Lieberman R, Moy L. Estrogen receptor expression in melasma: results from facial skin of affected patients. *J Drugs Dermatol* 2008; 7: 463–465.
14. Cardinali G, Kovacs D, Picardo M. Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo. *Ann Dermatol Venereol* 2012; 139(Suppl 4): S148–S152.
15. Kang HY, Suzuki I, Lee DJ et al. Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1692–1700.
16. Kim NH, Lee CH, Lee AY. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 84–92.
17. Kim NH, Cheong KA, Lee TR, Lee AY. PDZK1 upregulation in estrogen related hyperpigmentation in melasma. *J Invest Dermatol* 2012; 132:2622–2631.
18. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26: 1533-1537.
19. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27: 151-156.

#### **4. Segundo manuscrito**

**Manuscrito no formato da revista:** J Eur Acad Dermatol Venereol

**Title:** Avaliação das diferentes vias de estímulo à pigmentação epidérmicas no melasma facial: um estudo de imunofluorescência.

**Runninghead:** Expressão de p53,  $\alpha$ -MSH, MC1R, p38, COX2 e IL1 $\alpha$  no melasma.

**Authors:**

G Brianezi (1)

LDB Miot (2)

MEA Marques (1)

HA Miot (2)

(1) Departamento de Patologia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil

(2) Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, 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@fmb.unesp.br](mailto:heliomiot@fmb.unesp.br)

Phone/FAX: +55 14 38824922

**Funding Source:** FAPESP – Grants nº 2012/09233-5, 2012/05004-1

**Conflictofinterest:** None

## Resumo

**Introdução:** A pigmentação melânica da pele pode ser estimulada por diferentes vias de sinalização, sendo a radiação ultravioleta, citocinas dérmicas e inflamação epidérmica, os modelos mais usuais. A melanogênese no melasma não foi adequadamente avaliada quanto às vias envolvidas.

**Objetivo:** Investigar a ativação das diferentes vias de estímulo à pigmentação epidérmica no melasma facial.

**Material e métodos:** Pares de biópsias faciais (2mm) de 16 mulheres com melasma e de pele adjacente (<2 cm) foram processadas para estudo de imuno fluorescência marcada para p53, p38,  $\alpha$ MSH, MC1R, IL-1 $\alpha$  e COX2. A expressão queratinocítica e melanocítica dos marcadores foi avaliada.

**Resultados:** Houve aumento da expressão proteica de  $\alpha$ MSH e MC1R no epitélio e melanócitos de pele com melasma comparado à pele adjacente. Não houve diferença na expressão proteica de COX2, p38, IL-1 $\alpha$  e p53 entre os grupos.

**Conclusão:** A melanogênese do melasma envolve a secreção epitelial de  $\alpha$ MSH, independentemente da ativação via radiação ultravioleta/p53, IL-1 $\alpha$ , p38 e COX2/PgE<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** Melasma, melanina, p53, p38,  $\alpha$ MSH, COX2, pigmentação, radiação ultravioleta.

## Introdução

Melasma é uma dermatose crônica e frequente, caracterizada por hiperpigmentação melânica da pele, principalmente em topografias expostas ao sol. Apresenta-se como manchas acastanhadas simétricas, de bordas irregulares e limites definidos (1, 2).

Os principais fatores de riscos associados ao desenvolvimento do melasma são exposição crônica à RUV, gravidez, contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal, cosméticos, drogas fotossensíveis, inflamação e estresse (2-6). Há elevada incidência familiar (40-60%), sugerindo que seu desenvolvimento dependa da interação do ambiente em indivíduos susceptíveis, caracterizando-se como doença multifatorial (1, 7).

A pele com melasma apresenta características fenotípicas de um fototipo mais elevado quando comparada à pele adjacente. Há aumento na quantidade e maturação dos melanossomas, melanócitos hipertrofiados e maior expressão de citocinas inflamatórias (IL17, iNOS, endotelina, NF- $\kappa$ B), além de fatores de crescimento como  $\alpha$ MSH, SCF, bFGF, HGF e NGF (8-12).

A pigmentação melânica da pele pode ser estimulada por diferentes vias de sinalização no melanócito. Os principais modelos de melanogênese decorrem da exposição à radiação ultravioleta (RUV) e hiperpigmentação pós-inflamatória (HPI).

RUV estimula a produção de proopiomelanocortinas, como o  $\alpha$ MSH, diretamente nos melanócitos. Nos queratinócitos, isso é mediado pela expressão da proteína p53 (13-16). O  $\alpha$ MSH epitelial se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R) na parede do melanócito, o que leva ao aumento da atividade do MITF, responsável pela regulação transcricional de enzimas essenciais para a melanogênese, principalmente a tirosinase (TYR) (9, 17-19). RUV atinge também os fibroblastos da derme superior, promovendo síntese de *stemcellfactor* e *upregulation* da produção de seu receptor c-kit nos melanócitos, levando à ativação direta do MITF (20).

A via inflamatória que induz a HPI também estimula a produção epitelial de  $\alpha$ MSH, independentemente do estímulo da RUV. Após dano aos queratinócitos, há aumento da produção  $\text{PgE}_2$  epitelial (sintetizada pela enzima COX2) e IL-1 que também induzem à síntese de  $\alpha$ MSH, além de estímulos de reparo como os induzidos por bFGF, HGF, *stemcellfactor* e a ativação da via Wnt, secretados pelos fibroblastos (9, 19, 21-25).

Este estudo objetivou investigar a ativação das diferentes vias de melanogênese epidérmicas no melasma facial e pele adjacente, a partir da expressão da proteína p53 (melanogênese decorrente da exposição à RUV), p38 (dano oxidativo), IL-1 $\alpha$  (dano inflamatório) e COX2 (induzida pelo estresse inflamatório local).

## Casuística e métodos

### BIÓPSIAS

Foram coletadas biópsias (2mm) de pele facial com melasma e sã adjacente de 13 mulheres adultas, atendidas no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP no período de janeiro de 2013 a julho de 2015, sem restrição de fototipo e sem tratamento há mais de 30 dias, exceto filtro solar. Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e o estudo foi aprovado pelo Comitê local de Ética em Pesquisa (CEP) Protocolo 3973-2011.

### IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cortes histológicos das biópsias foram desparafinizados e re-hidratados no TOXICAM (Unesp). As padronizações dos protocolos de imunofluorescência dependeram da titulação da menor concentração de anticorpos principais capazes de serem detectadas nas lâminas de controles positivos (dados não mostrados). A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento à 117°C por 3 minutos em solução de Trilogy® (Cell Marque, 1:20), seguidos de bloqueio das proteínas com leite 5%. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário por duas horas para  $\alpha$ MSH (Abcam, 1:100), MC1R (Abcam, 1:50) e COX2 (Abcam, 1:100); ainda *overnight* para p53 (CellSignaling Technology, 1:100) ou p38 (Abcam, 1:200) e IL-1 $\alpha$  (Abcam, 1:100), seguidos de

incubação do anticorpo secundário por 30 minutos (AlexaFluor 594 ou AlexaFluor 488). Para o MSH, MC1R e COX2 foi realizado imunofluorescência de dupla marcação com o Melan-A (Abcam, 1:50) a partir de incubação por 2 horas seguidas de incubação do anticorpo secundário (AlexaFluor 488) por 30 minutos. A contracoloração foi realizada com DAPI para marcação nuclear.

#### ANÁLISE DE IMAGEM

As lâminas foram fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX41 na magnificação de 1000x, resultando em imagens tipo \*TIFF com 1280x1024 pixels (24 bits de cor). A intensidade de marcação foi analisada com o software ImageJ v1.50c para o epitélio total, basal, suprabasal, melanócito ou derme (variação de 0 a 255 tons de cinza) para os diferentes canais de cor (26, 27). A expressão nuclear de p53 e citoplasmática de p38 foram analisadas a partir do percentual de núcleos marcados por campo (28).

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados contínuos foram representados pelas medianas e quartis (p25-p75) se a normalidade não fosse evidenciada ao teste de Shapiro-Wilk. As amostras foram comparadas de acordo com o local da biópsia e a estrutura epitelial mensurada por modelo linear generalizado de efeitos mistos, com ajuste de probabilidade (gama ou lognormal) e matriz de covariância robusta. O percentual de núcleos marcados pelo p53 ou p38 foi comparado entre os grupos pelo teste de Wilcoxon (29, 30). Os dados foram analisados no software IBM SPSS 22.0 (31). Foi considerado significativo valores de  $p \leq 0,05$ .

### Resultados

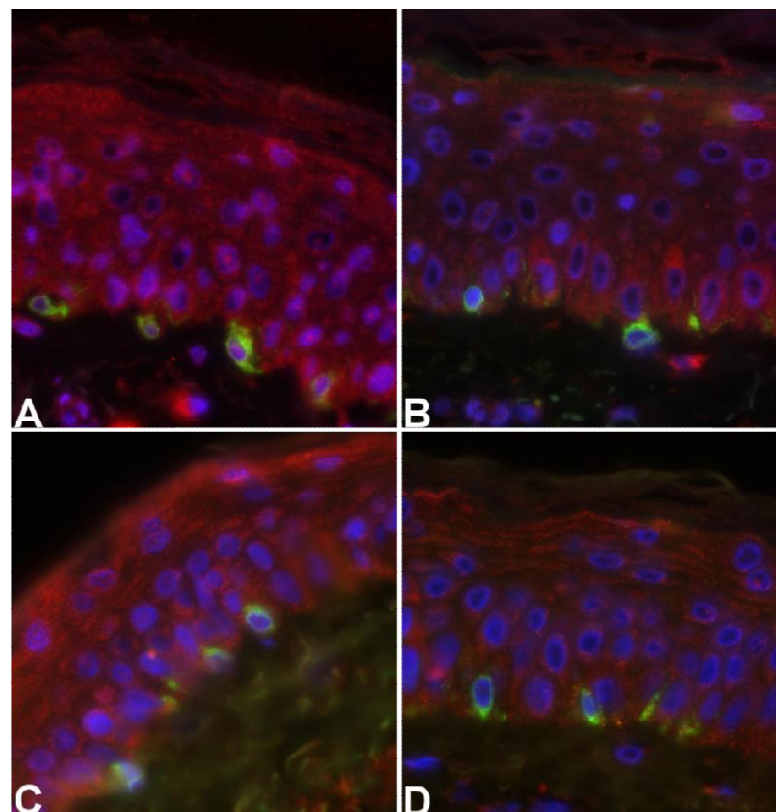
Houve maior intensidade de fluorescência em todos os locais avaliados (epitélio total, basal, suprabasal e melanócitos) para MC1R na pele com melasma (Tabela 1, Figura 1). Adicionalmente, detectou-se maior intensidade de fluorescência para  $\alpha$ MSH no epitélio total, basal e nos melanócitos no melasma (Tabela 1, Figura 1).

Não foi observada diferença na intensidade de fluorescência para COX2 e IL-1 $\alpha$  nas estruturas epiteliais avaliadas do melasma e pele são adjacente, assim como não diferiram os percentuais de marcação de p53 e p38 (Tabela 1, Figuras 2 e 3). Não houve marcação de p38 nas células da epiderme.

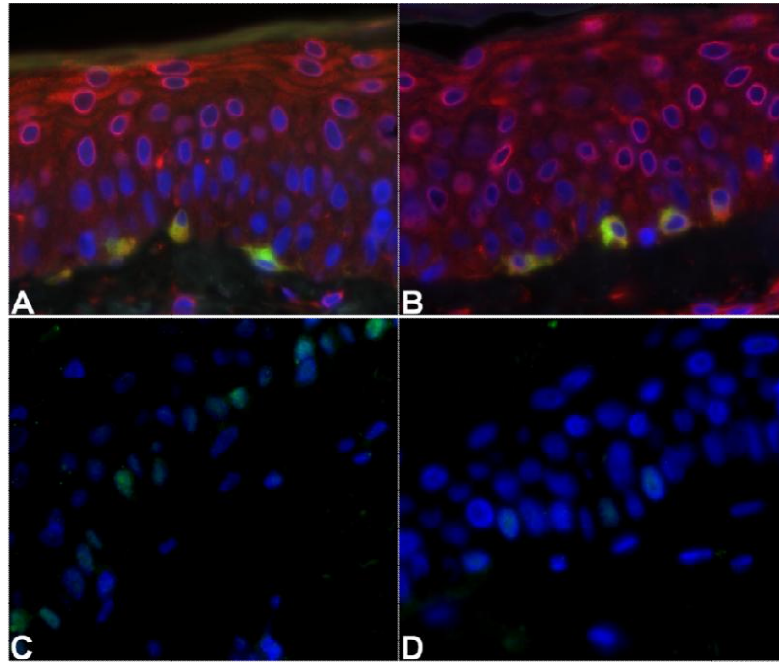
**Tabela 1:** Comparação da intensidade de fluorescência para  $\alpha$ MSH, MC1R, COX2 e IL1- $\alpha$  nas estruturas da pele, além da avaliação do percentual de núcleos marcados pelo p53 na epiderme e p38 na derme acometidas com melasma e pele sã adjacente.

Variáveis		Melasma*	Controle*	P
$\alpha$ MSH	Epitélio total	34,00 (24,48-39,04)	25,75 (20,67-33,88)	<b>0,05</b>
	Epitélio basal	36,50 (27,05-45,75)	29,75 (21,38-37,75)	<b>0,04</b>
	Epitélio suprabasal	31,38 (23,22-39,11)	23,38 (19,93-31,33)	0,06
	Melanócito	50,68 (37,35-56,36)	41,37 (29,49-46,75)	<b>0,05</b>
MC1R	Epitélio total	56,73 (53,88-66,00)	53,40 (42,84-58,88)	<b>0,00</b>
	Epitélio basal	58,97 (51,37-64,53)	58,59 (43,93-61,58)	<b>0,04</b>
	Epitélio suprabasal	61,58 (53,20-67,36)	49,70 (44,11-58,43)	<b>0,00</b>
	Melanócito	60,50 (51,36-67,27)	62,42 (45,11-68,13)	<b>0,04</b>
COX2	Epitélio total	40,49 (36,76-50,89)	45,04 (41,90-56,03)	0,36
	Epitélio basal	35,47 (32,15-44,92)	40,59 (39,08-46,24)	0,43
	Epitélio suprabasal	47,15 (43,05-56,68)	49,84 (43,73-67,59)	0,29
	Melanócito	38,27 (34,90-53,00)	50,47 (44,99-56,05)	0,14
IL-1 $\alpha$	Epitélio total	29,27 (23,00-37,21)	34,42 (23,73-35,35)	0,94
	Derme superior	24,52 (17,11-30,04)	27,97 (22,17-34,73)	0,09
p38	% células dérmicas	36,45 (24,10-42,75)	28,80 (18,30-39,98)	0,13
p53	% células epidérmicas	1,69 (0,00-2,33)	0,00 (0,00-2,17)	0,92

Intensidade de fluorescência varia de 0 a 255, \*Mediana (p25-p75)



**Figura 1.** Imunofluorescência de dupla marcação (A) Melasma. Marcação  $\alpha$ MSH (vermelho) e Melan-A (verde) (B) Pele sã adjacente. Marcação  $\alpha$ MSH (vermelho) e Melan-A (verde) (C) Melasma. Marcação MC1R (vermelho) e Melan-A (verde) (D) Pele sã adjacente Marcação MC1R (vermelho) e Melan-A (verde). Magnificação 1000x.



**Figura 2.** (A) Melasma. Imunofluorescência de dupla marcação para COX2 (vermelho) e Melan-A (verde) (B) Pele sã adjacente. Marcação COX2 (vermelho) e Melan-A (verde) (C) Melasma. Imunofluorescência nuclear para p53 (verde) (D) Pele sã adjacente. Marcação p53 (verde). Magnificação 1000x.

## Discussão

A ativação do MC1R pelo  $\alpha$ MSH nos melanócitos é a principal via de estímulo à melanogênese, sendo, o MC1R, o principal determinante da variabilidade na pigmentação humana, regulando a quantidade e o tipo de melanina produzida nos melanócitos. Esse receptor é altamente polimórfico com mais de 80 variantes alélicas identificadas nos diferentes grupos populacionais (32, 33).

No melasma, MC1R e  $\alpha$ MSH, estão aumentados nos queratinócitos e melanócitos, corroborando com as características fenotípicas de hiper melanogênese encontradas na pele lesada (9, 12). A função do MC1R nos queratinócitos não é ainda bem compreendida, mas sua expressão pode ser induzida pelos maiores níveis de  $\alpha$ MSH em todo epitélio (17, 34) (35, 36).

A produção de  $\alpha$ MSH pode ser estimulada pela RUV nos queratinócitos e melanócitos, mas também por estímulos inflamatórios da epiderme (p.ex. IL-1 e PgE<sub>2</sub>) ou da derme, independentemente da RUV (20, 21, 37-39).

A proteína p53, sintetizada a partir do gene 17p13.1, é um importante supressor tumoral associado ao reparo do DNA lesado, induz apoptose de células que apresentam dano irreversível ao DNA, promove interrupção do ciclo celular e da angiogênese, impedindo a replicação de células mutantes. A epiderme da pele fotoexposta expressa p53 em resposta à RUV, sendo marcador de

exposição solar e fotoproteção(40-43). No melasma, a expressão epitelial de p53 não diferiu da pele adjacente, submetida ao mesmo regime de fotoexposição. Enquanto isso, houve significativo aumento de expressão de  $\alpha$ MSH, levando à hipótese que, nesta discromia, a melanogênese seja mantida por uma via não dependente do estímulo ao p53 via RUV.

Enquanto a enzima COX1 apresenta expressão constitucional na pele e participa do processo de proliferação epitelial, COX2 tem efeitos pró-inflamatórios e se expressa em situações patológicas, estimulando a proliferação celular, angiogênese e resistência à apoptose (44-46). O dano queratinocítico leva à síntese de  $\text{PgE}_2$  pela COX2 epidérmica, o que induz à produção de  $\alpha$ MSH. Essa via melanogênica é independente de RUV e da expressão de p53 (20, 21, 47).

Nosso estudo identificou expressão de COX2 epitelial tanto no melasma quanto na pele adjacente, porém, a falta de diferença entre os grupos amostrados desabona a hipótese que a melanogênese, induzida por  $\alpha$ MSH seja dependente de  $\text{PgE}_2$ . Por outro lado, pode decorrer de dano crônico em ambos os epitélios, como ocorre no fotoenvelhecimento, identificado em ambos os locais biopsiados(44, 48). A amostragem de pele retroauricular (fotoprotégida) desses pacientes deve promover uma comparação adequada quanto ao papel do fotoenvelhecimento na expressão de COX2 e sua relação com o melasma.

Em contrapartida, COX2 foi identificada, por investigação genômica e tissular, como predominante na pele com melasma malar em um estudo de 20 pacientes sem medidas de fotoproteção por quatro semanas, assim como maior número de mastócitos na pele lesada (23). Em nossa casuística, as pacientes foram submetidas à fotoproteção por quatro ou mais semanas, e ainda assim, mostraram atividade melanogênica e aumento diferencial da expressão de  $\alpha$ MSH. Mastócitos são também marcadores de exposição solar intensa, corroborando a diferença entre as amostras (49).

Esses achados sugerem que a via COX2/ $\text{PgE}_2$  esteja envolvida no processo de piora clínica da doença, apesar de não ser necessária para a sua atividade. Isso se reflete clinicamente quando o uso de filtro solar, mesmo por longo tempo, não promove remissão completa das lesões, ou ainda que pacientes em uso de anti-inflamatórios não-hormonais mantenham atividade das lesões.

Desde que a origem do estímulo à melanogênese do melasma não seja explicada completamente pelas vias RUV/p53 e COX2/ $\text{PgE}_2$ , cabe investigar indutores dérmicos desse processo.

A derme superficial do melasma apresenta ativa degradação do colágeno e da zona de membrana basal, resultando em um ambiente inflamatório e oxidativo, com proliferação vascular e liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento como *stemcellfactor*, HGF, bFGF e NGF (9, 19, 21-25). O aumento de c-kit e *stemcellfactor* foi evidenciado no melasma, e apresenta

potencial melanogênico independentemente de  $\alpha$ MSH (20, 50).

O dano tecidual crônico da derme superior no melasma pode promover uma reação de reparo que envolva queratinócitos. Em processos cicatriciais cutâneos,  $\alpha$ MSH/MC1R estão hiperexpressos no epitélio, e parecem promover uma intercomunicação com fibroblastos (51). Citocinas inflamatórias, como a IL-1 são ativas no processo de reparo tecidual e também podem induzir a síntese epitelial de  $\alpha$ MSH (20, 52). O conceito de melasma como uma decorrência do processo de injúria/reparo da derme superior também justificaria a hiperexpressão de fatores de crescimento teciduais identificados na doença.

Nosso estudo não identificou diferença da expressão de IL-1 $\alpha$  no epitélio ou na derme entre a pele com melasma e adjacente, o que sugere que o processo primário de indução de melanogênese não dependa do dano inflamatório agudo, como ocorre na HPI (37, 53). Da mesma forma, a expressão de p38 não mostrou diferença entre as topografias estudadas, ratificando que o dano inflamatório ou oxidativo ocorra simultaneamente em ambas as topografias, sem evidência de dano específico ao epitélio (54). Esses resultados aludem à necessidade da investigação de diferentes vias de estímulo à melanogênese, especialmente relacionados à interação epitélio-mesenquimal.

Este estudo envolveu um número restrito de pacientes, exclusivamente do sexo feminino e oriundos de um único centro. Entretanto, o modelo comparativo utilizado (melasma vs pele adjacente), é bastante sensível às alterações estudadas, pelo caráter pareado das variáveis estudadas, demandando menor dimensão amostral (55). A homogeneidade quanto ao sexo e região geográfica dos pacientes fortalece a validade interna dos resultados, orientando a necessidade da repetição da investigação em outras realidades étnicas, sócio-culturais, explorando outras topografias e envolvendo o sexo masculino.

De acordo com a expressão de proteínas investigada neste estudo, o padrão de melanogênese do melasma não parece seguir as vias convencionais das principais dermatoses pigmentares quando explorados a partir da imunofluorescência(11). Apesar de se tratar de um método semiquantitativo, a identificação topográfica da expressão de peptídeos, como é evidenciado pela imunofluorescência, permite elaborar hipóteses fisiopatológicas das bases da melanogênese no melasma. Técnicas genômicas e proteômicas devem ser orientadas posteriormente para esclarecer o papel dos diferentes achados, assim como o processo de regulação das vias identificadas neste estudo.

### **Conclusão:**

Nossos resultados sugerem que a hiper melanogênese do melasma envolve a secreção

epitelial de  $\alpha$ MSH, independentemente da ativação via radiação ultravioleta/p53, IL-1 $\alpha$ , p38 e COX2/PgE<sub>2</sub>.

## Referências

1. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Feb;27(2):151-6.
2. Handel AC, Miot LD, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*. 2014 Sep-Oct;89(5):771-82.
3. Im S, Lee ES, Kim W, On W, Kim J, Lee M, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes. *J Korean Med Sci*. 2002 Feb;17(1):58-64.
4. Robins AH. Melanosis after prolonged chlorpromazine therapy. *S Afr Med J*. 1975 Aug 30;49(37):1521-4.
5. Wolf R, Wolf D, Tamir A, Politi Y. Melasma: a mask of stress. *Br J Dermatol*. 1991 Aug;125(2):192-3.
6. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol*. 1995 Dec;131(12):1453-7.
7. Handel AC, Lima PB, Tonolli VM, Miot LD, Miot HA. Risk factors for facial melasma in women: a case-control study. *Br J Dermatol*. 2014 Sep;171(3):588-94.
8. Bak H, Lee HJ, Chang SE, Choi JH, Kim MN, Kim BJ. Increased expression of nerve growth factor receptor and neural endopeptidase in the lesional skin of melasma. *Dermatol Surg*. 2009 Aug;35(8):1244-50.
9. Miot LD, Miot HA, Poletini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol*. 2010 Oct;32(7):676-82.
10. Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol*. 2002 Jan;146(1):165-7.
11. Lee A-Y. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatologica Sinica*. 2014;32(4):233-9.
12. Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. [Physiopathology of melasma]. *An Bras Dermatol*. 2009 Nov-Dec;84(6):623-35.
13. Garcia-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jimenez-Cervantes C. MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Sep;27(5):699-720.
14. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Aug 28;1313(2):130-8.
15. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*. 2007 Mar 9;128(5):853-64.
16. Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M, Cestari T, Chan H, Grimes P, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Nov;23(11):1254-62.
17. Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*. 2002 Dec;15(6):433-9.
18. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet*. 2009 Apr 15;18(R1):R9-17.
19. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis\*. *An Bras Dermatol*. 2013 Jan-Feb;88(1):76-83.
20. Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(2):e189-e99.
21. Gledhill K, Rhodes LE, Brownrigg M, Haylett AK, Masoodi M, Thody AJ, et al. Prostaglandin-E2 is produced by adult human epidermal melanocytes in response to UVB in a melanogenesis-independent manner. *Pigment cell & melanoma research*. 2010;23(3):394-403.
22. Passeron T. Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Jan;27 Suppl 1:5-6.
23. Rodriguez-Arambula A, Torres-Alvarez B, Cortes-Garcia D, Fuentes-Ahumada C, Castaneda-Cazares JP. CD4, IL-17, and COX-2 Are Associated With Subclinical Inflammation in Malar Melasma. *Am J Dermatopathol*. 2015 Oct;37(10):761-6.
24. Samaka RM, Bakry OA, Shoeib MA, Zaaza MM. Expression of iNOS and NF-kappaB in melasma: an immunohistochemical study. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2014 Oct;36(5):245-57.
25. Cardinali G, Kovacs D, Picardo M. [Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo]. *Ann Dermatol Venereol*. 2012 Nov;139 Suppl 3:S96-101.
26. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;Chapter 14:Unit14 5.
27. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5.
28. Brianezi G, Minicucci EM, Marques ME, Miot HA. Evaluation epidermal p53 immunostaining by digital image

- analysis. *Skin Res Technol.* 2013 Feb;19(1):e108-12.
29. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials*. Bc Decker Hamilton, Ontario; 2008.
  30. Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta.* 2006 Apr;366(1-2):112-29.
  31. IBM SPSS 22.0 Statistics for Windows Armonk (NY): IBM Corp; 2013.
  32. Garcia-Borrón JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 2005 Dec;18(6):393-410.
  33. Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet.* 1997 Oct;6(11):1891-7.
  34. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochem Photobiol.* 2011 Sep-Oct;87(5):978-87.
  35. Bohm M, Luger TA, Tobin DJ, Garcia-Borrón JC. Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol.* 2006 Sep;126(9):1966-75.
  36. Roberts DW, Newton RA, Beaumont KA, Helen Leonard J, Sturm RA. Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures. *Pigment Cell Res.* 2006 Feb;19(1):76-89.
  37. Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA. Mechanisms for post-inflammatory hyperpigmentation and hypopigmentation. *Prog Clin Biol Res.* 1988;256:219-36.
  38. Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkotter C, Armstrong C, et al. The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:232-8.
  39. Luger T. Role of neuropeptides in UV-mediated photoageing and immunomodulation. *Clin Exp Dermatol.* 2000 Mar;25(2):162.
  40. Han X, Wang F, Yao W, Xing H, Weng D, Song X, et al. Heat shock proteins and p53 play a critical role in K+ channel-mediated tumor cell proliferation and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Oct;12(10):1837-46.
  41. Ling G, Persson A, Berne B, Uhlen M, Lundeberg J, Ponten F. Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Am J Pathol.* 2001 Oct;159(4):1247-53.
  42. Berne B, Ponten J, Ponten F. Decreased p53 expression in chronically sun-exposed human skin after topical photoprotection. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1998 Oct-Dec;14(5-6):148-53.
  43. Ponten F, Berne B, Ren ZP, Nister M, Ponten J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol.* 1995 Sep;105(3):402-6.
  44. Akunda JK, Chun KS, Sessoms AR, Lao HC, Fischer SM, Langenbach R. Cyclooxygenase-2 deficiency increases epidermal apoptosis and impairs recovery following acute UVB exposure. *Mol Carcinog.* 2007 May;46(5):354-62.
  45. Rundhaug JE, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008 Mar-Apr;84(2):322-9.
  46. Husvik C, Khuu C, Bryne M, Halstensen TS. PGE2 production in oral cancer cell lines is COX-2-dependent. *J Dent Res.* 2009 Feb;88(2):164-9.
  47. Yoshizaki N, Fujii T, Masaki H, Okubo T, Shimada K, Hashizume R. Orange peel extract, containing high levels of polymethoxyflavonoid, suppressed UVB-induced COX-2 expression and PGE2 production in HaCaT cells through PPAR-gamma activation. *Exp Dermatol.* 2014 Oct;23 Suppl 1:18-22.
  48. Surowiak P, Gansukh T, Donizy P, Halon A, Rybak Z. Increase in cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in keratinocytes and dermal fibroblasts in photoaged skin. *J Cosmet Dermatol.* 2014 Sep;13(3):195-201.
  49. Van Nguyen H, Di Girolamo N, Jackson N, Hampartzoumian T, Bullpitt P, Tedla N, et al. Ultraviolet radiation-induced cytokines promote mast cell accumulation and matrix metalloproteinase production: potential role in cutaneous lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2011 May;40(3):197-204.
  50. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim JY, Lee ES, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol.* 2006 Jun;154(6):1094-9.
  51. Muffley LA, Zhu KQ, Engrav LH, Gibran NS, Hocking AM. Spatial and temporal localization of the melanocortin 1 receptor and its ligand alpha-melanocyte-stimulating hormone during cutaneous wound repair. *J Histochem Cytochem.* 2011 Mar;59(3):278-88.
  52. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar;127(3):514-25.
  53. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors.* 2009 Mar-Apr;35(2):193-9.
  54. Pfundt R, van Vlijmen-Willems I, Bergers M, Wingens M, Cloin W, Schalkwijk J. In situ demonstration of phosphorylated c-jun and p38 MAP kinase in epidermal keratinocytes following ultraviolet B irradiation of human skin. *J Pathol.* 2001 Feb;193(2):248-55.
  55. Miot HA. Sample size in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras.* 2011;10(4):275-8.

## 5. Terceiro manuscrito

**Revista:** PigmCell Melanoma Res

**Title:** Fibroblast senescence, damage in upper dermis and at *lamina densa* in facial melasma: a comparative study.

**Running Head:** Fibroblast senescence, damage in upper dermis and *lamina densa* in facial melasma.

**Authors:**

G Brianezi (1)

LDB Miot (2)

DC Santos(3)

HA Miot (2)

(1) Departamento de Patologia (TOXICAM), FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil

(2) Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brazil

(3) Departamento de Morfologia, IBB-Unesp, Botucatu, SP, 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@fmb.unesp.br](mailto:heliomiot@fmb.unesp.br)

Phone/FAX: +55 14 38824922

**Funding Source:** FAPESP – Grants nº 2012/09233-5, 2012/05004-1

**Conflict of interest:** None

## Abstract

**Background:** The role of the dermis involvement in melasma is not completely understood. Several dermal abnormalities are found in melasma skin: basement membrane zone alterations, pendulous melanocytes, solar elastosis, metalloproteinases hyperactivity, hypercellularity, vascular proliferation as the expression of some inflammatory and growth factors.

**Objectives:** To explore dermis involvement and the possible role of fibroblast cell in the melasma pathogenesis, focusing on basal membrane zone, dermal collagen structure, pendulous melanocytes, and primary fibroblast culture. Additionally, to study basal keratinocyte and melanocyte cytoplasmic organelles.

**Methods:** Pairs of facial skin biopsies (2 mm) from 16 women with melasma and normal skin (<2 cm apart) were processed by Transmission Electronic Microscopy, picosirius red and immunohistochemistry for Melan-A counterstained with Periodic acid–Schiff stain. Cytoplasmic organelles (keratinocyte and melanocyte), basement membrane zone, dermal collagen organization and melanocyte (total and pendulous) counting were assessed. Primary fibroblast were cultivated to assess senescence (SA- $\beta$ -gal) and gene expression profile (real-time PCR array).

**Results:** There were greater amount of cytoplasmic organelles inside basal keratinocytes and melanocytes in melasma, as well as structural damaged areas in the *lamina densa*, compared to healthy adjacent skin. Keratinocytes melanosomes were at higher maturation stage and melanocytes mitochondria were prominent in melasma skin. Keratinocytes and melanocytes disclosed microvesicles adjacent to basal membrane and the lamina densa breakings. Pendulous melanocytes were more numerous as superficial dermis collagen structure was more compromised in melasma. SA- $\beta$ -gal fibroblasts were increased and the expression of some genes (COL4A1, IL6, ESR2, DKK3, CCL2, WIF1, WNT3A, HGF, IL1B, MMPs 1-7-9) were altered in fibroblast cell culture of melasma.

**Conclusion:** The prominence of cytoplasmic organelles from melanocytes and keratinocytes evidences the involvement of the whole epidermal melanin unit in melasma. The upper dermis and lamina densa damage suggest the role of dermal injury/repair process in disease pathogenesis. Fibroblast senescence was more noticeable in melasma, leading to an impaired repair and inflammatory response that can stimulate the focal pigmentary phenotype.

**Keywords:** Melasma, Ultraviolet rays; Pigmentation disorders; Collagen; Transmission Electronic Microscopy.

## Introduction

Melasma is a common acquired pigmented disorder due to an increased local epidermal melanin unit activity. It affects sun-exposed sites (e.g. face) mainly in women throughout reproductive years (1). The pathogenesis is not fully understood and the role of skin basement membrane zone alterations, dermis damage and fibroblast activity in disease development and maintenance are still unknown.

In contrast to adjacent photoexposed skin, areas with melasma present epidermal hypermelanization (with more mature melanosomes), hypertrophied melanocytes, evident solar elastosis, metalloproteinase (MMP) hyperactivity, dermal hypercellularity, vascular proliferation, increased expression of inflammatory mediators such as iNOS, IL-17, NF- $\kappa$ B, endothelin, and growth factors such as VEGF, stem cell, hepatocyte, fibroblast and nerve growth factor (2-5).

Pendulous melanocytes into dermis have been described in melasma as well as basement membrane changes under these protruded cells. There is a decrease in type I collagen and increase in MMP (1, 2, 3 and 9) activity (2, 4, 6, 7). Some genes related to lipid metabolism were downregulated in melasma skin, as function and repair of skin barrier were impaired (8-10).

There are higher expression of fibroblast releasing stem cell factor and its epidermal receptor c-kit in melasma skin, both changes can also be stimulated by UV radiation (11). Meanwhile, there is few data about the role of fibroblast, and dermal components in melasma pathogenesis.

This study aimed to explore dermis involvement and the role of fibroblasts in the melasma pathogenesis, focusing on basal membrane zone, dermal collagen structure, pendulous melanocytes and primary culture of fibroblast cell. Additionally, to study basal keratinocyte and melanocyte cytoplasmic organelles.

## Material and Methods

The project was approved by Institutional Review Board on Ethics (CEP: 3973-2011), and was performed at Botucatu Medical School (Unesp), Brazil, between 01/2013 and 08/2014.

Pairs of facial skin biopsies (2 mm) from 16 adult women with facial melasma and without treatment for 30 days except sunscreen, were taken from melasma and clinically normal adjacent skin (<2 cm apart).

Two patients samples were processed by Transmission Electronic Microscopy (TEM) for basement membrane integrity, lamina densa structure and cytoplasm organelles. Samples processing and analysis were performed at Departamento de Morfologia (IBB-Unesp).

Eight samples were stained to picosirius red to evaluate dermal collagen fragmentation;

and, in six patients, the samples are processed by DAB-immunohistochemistry for Melan-A (1:50, clone A103, DAKO Cytomation, Hamburg, Germany) counterstained with Periodic Acid-Schiff stain (PAS) for total and pendulous melanocyte counting (per histologic field), and basement membrane assessment. Samples processing and analysis were performed at TOXICAM (Unesp).

Histological slides stained by picosirius red were photographed in a standardized form (\*tiff images; 1280x1024 pixels; 24 bit color) and analyzed in ImageJ 50c (12, 13). The morphologic structure of upper dermal collagen was assessed by the fractal dimension after color deconvolution (Fast red-Fast blue – plugin: [http://fiji.sc/Colour\\_Deconvolution](http://fiji.sc/Colour_Deconvolution)) preprocessing (14, 15).

### **Primary culture of fibroblast**

Primary culture of fibroblasts were established from melasma and adjacent facial skin biopsies of five women attended at Botucatu Medical School (Unesp), Brazil. The fibroblast culture were maintained in medium 106 (Gibco™) contained growing factors (LSGS Kit, Gibco™).

The fibroblast were plated at a density of  $5 \times 10^3$  in a 12 well cell culture plate, and were performed the senescence assessment by Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology®) following instructions from the manufacturer.

For growing curve, the fibroblast were plated at a density  $1 \times 10^4$  cell in a 6 well cell culture plate and the cell number was evaluated after 2, 5 and 8 days.

The real-time PCR array (96 well plate, Custom RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays, Qiagen) were performed in the primary fibroblasts cells to assess the gene expression for 42 genes (Table 2). The total RNA was obtained with RNase Mini Kit (Qiagen), the reverse transcription of the RNA was performed using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit for RT-PCR (Qiagen) following the instructions from manufacturer. The gene expression was considered altered when the fold change was less than 0.5 and higher than 1.5.

### **Statistical analysis**

Continuous data were represented by mean and standard deviation or median and quartiles (p25-p75), and the effect size for gene expression was estimated by the fold change: melasma/adjacent skin  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  expression (16). Additionally, they were compared by paired samples Student's t-test, Wilcoxon's test or Generalized Estimated Equations (after imputation of missing data). Normality was assessed by Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by Levene's test (17-19). Data was analyzed in IBM SPSS 22.0 (20). Significance was set as  $p \leq 0.05$ .

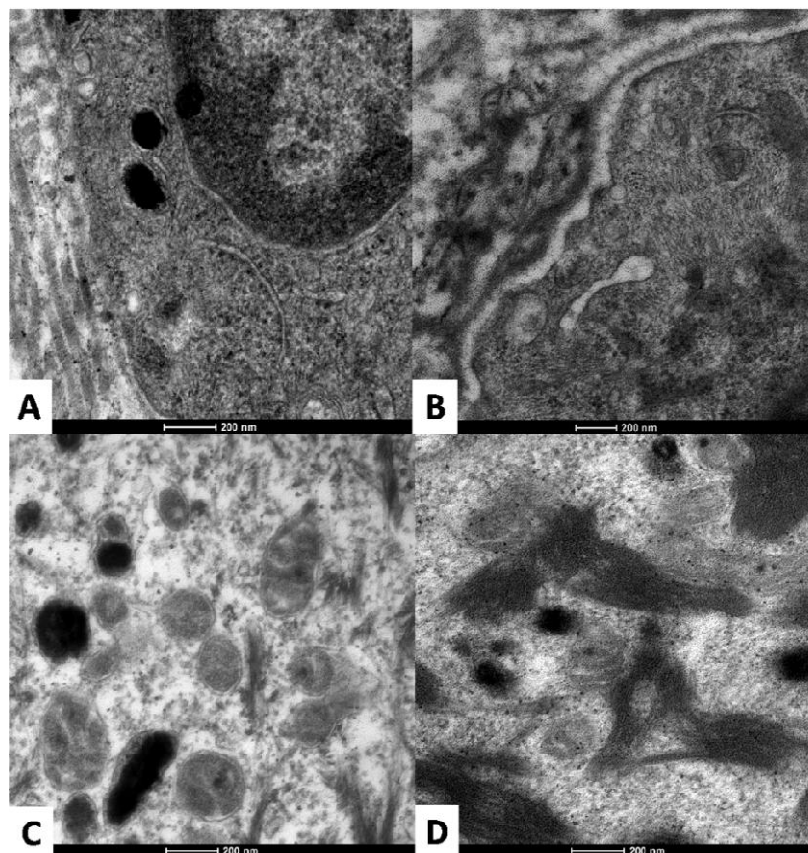
## **Results**

There were greater amount of damaged areas in the basement membrane of the melasma skin compared to healthy adjacent skin at TEM appraisal. The injuries were characterized as

disruption, delamination, frequently gaps, lesser structural density lamina densa and deletion of anchorage filaments at lamina lucida (Figure 1).

The number of cytoplasmic organelles were higher in melasma skin in both keratinocytes and melanocytes. Melanosomes were more numerous and at higher maturation stage inside the keratinocytes (Figure 2). The melanocytes mitochondria were abundant in melasma skin as well as its endoplasmic reticulum.

Microvesicles were numerous in the adjacency of the basal keratinocytes and melanocytes membrane. Their location close to the lamina densa breakings and the anchoring filaments damage (Figure 2) was noticeable. Pendulous melanocytes were also evident in TEM (Figure 2).



**Figure 1.** Transmission Electronic Microscopy from melasma and normal adjacent facial skin. (A) Melasma basement membrane zone under a melanocyte. Severe structural discontinuity of lamina densa and decrease of its electronic density (B) Basement membrane zone under a melanocyte from adjacent skin. (C) Melasma keratinocytes with greater number and matured melanosomes as prominent organelles. (D) Keratinocytes from adjacent skin.

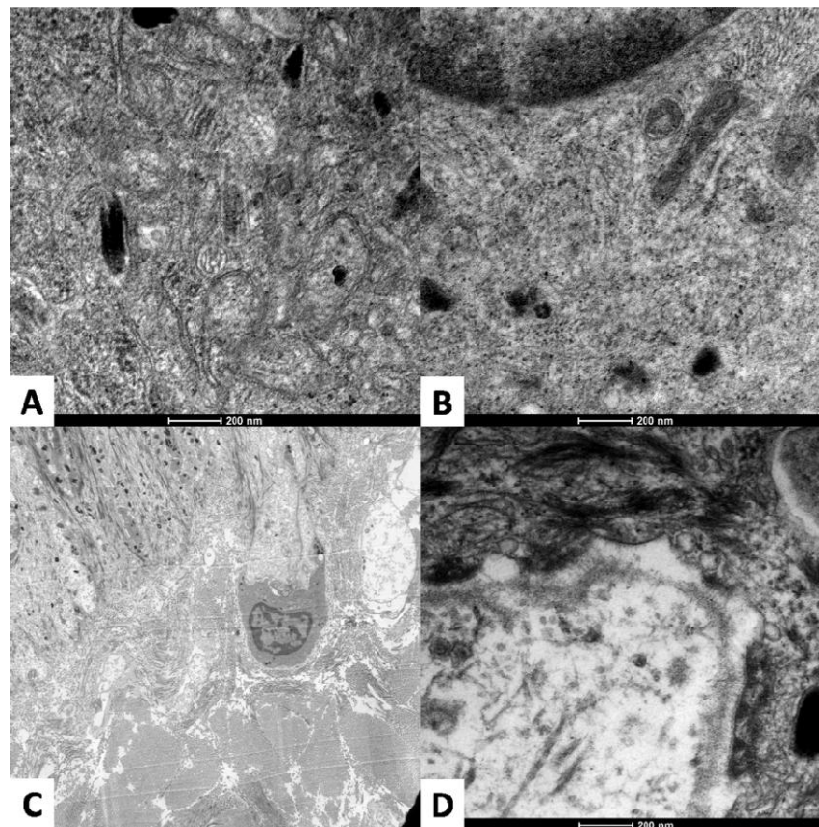
Basement membrane disruptions were significantly higher in melasma skin when quantified at the PAS staining (Table1 and Figure 2). The melanocyte total number was not different

between melasma and adjacent normal skin; conversely, the density of pendulous melanocytes were significantly increased in melasma skin (Table 1, Figures 2 and 3).

Upper dermis collagen was more unstructured in melasma samples, median (p25-p75) fractal dimension 1.19 (1.11-1.25) vs 1.31 (1.21-1.36) ( $p=0.04$ ) (Figure 4).

Primary fibroblast culture from melasma were less fusiform in shape and have a greater proportion of SA- $\beta$ -gal stained cells than adjacent skin for all samples: median 0.58 (0.47-0.66) vs. 0.42 (0.38-0.51) ( $p=0.06$ ) (Figure 4). Additionally, the cellular growth curves were less inclined for the melasma samples with significance regarding time and group\*time interaction ( $p<0.01$ ) (Figure 5).

Alterations in the expression of 12 genes were identified in fibroblast cells isolated from melasma skin compared to fibroblast cells isolated from adjacent healthy skin. The MMP1, 7 and 9, CCL2, IL6, ESR2, WIF1, WNT3A and HGF genes are upregulated and the COL4A1, DKK3 and IL1B gene are downregulated (Table 2).

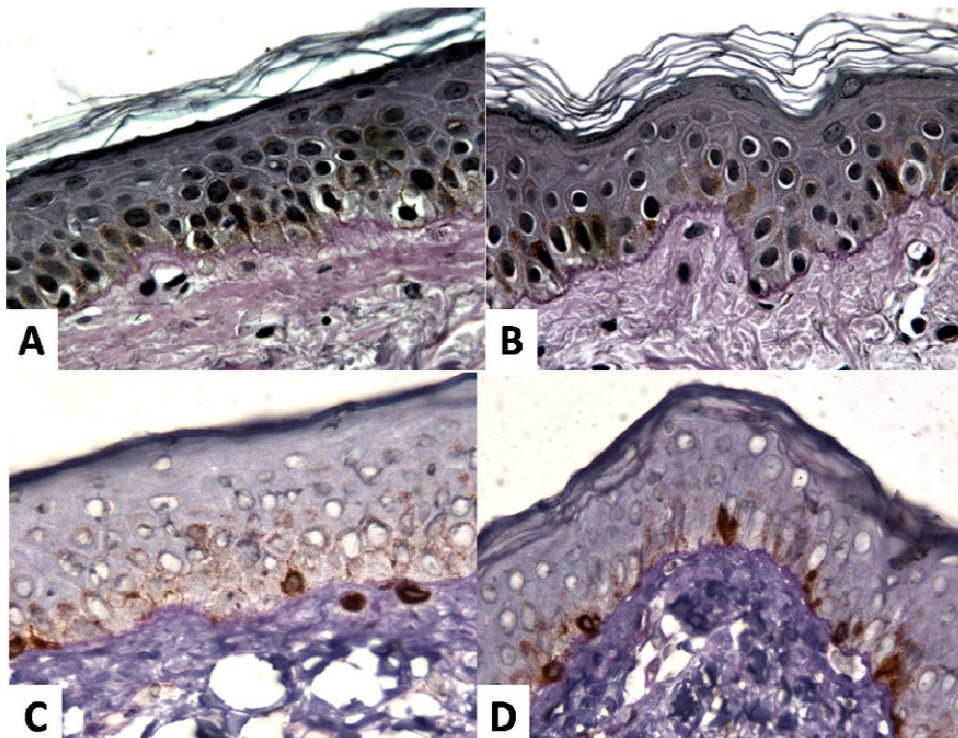


**Figure 2.** Transmission Electronic Microscopy from melasma and normal adjacent facial skin. (A) Melasma. Melanocytes with prominent rough endoplasmic reticulum and numerous mitochondria. (B) Melanocyte cytoplasm from adjacent skin. (C) Electronic microscopy of a pendulous melanocyte from melasma. (D) Small vesicles inside basal keratinocytes closed to the basal membrane and near the lamina densa and anchor filaments discontinuities.

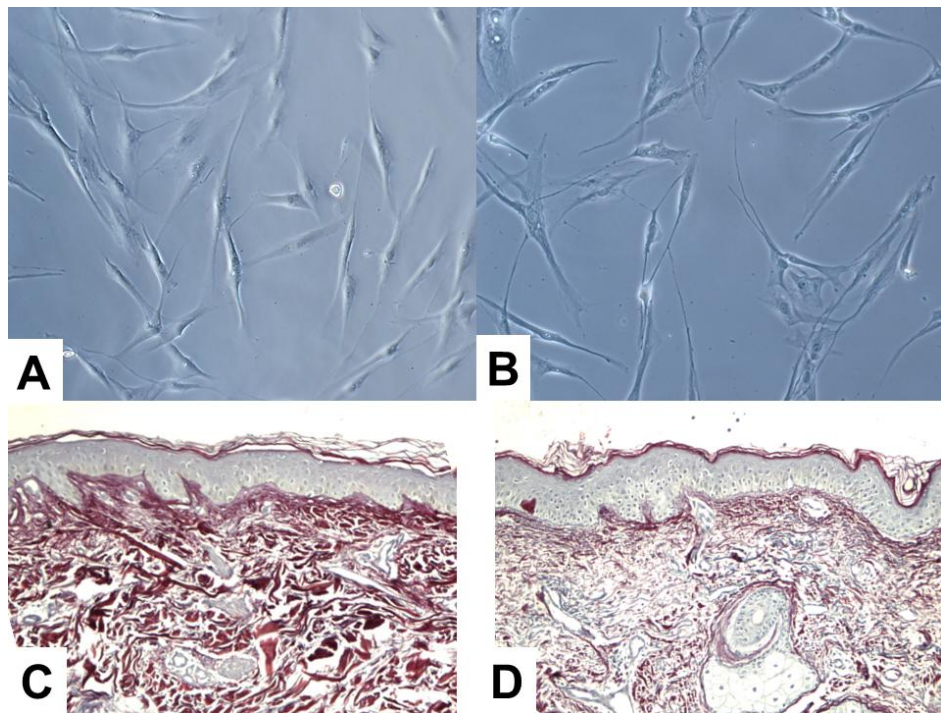
**Table 1.** Comparison of basement membrane and melanocyte characteristics between melasma and normal adjacent skin (n=6 patients; approximately 13 fields each histologic fragment).

Variables	Melasma*	Adjacent skin*	p-value**
Basement membrane disruptions#	0.65 (0.25)	0.13 (0.17)	<0.01
Total melanocyte count#	5.37 (2.20)	5.30 (1.10)	0.94
Pendulous melanocytes#	0.94 (0.26)	0.39 (0.21)	<0.01

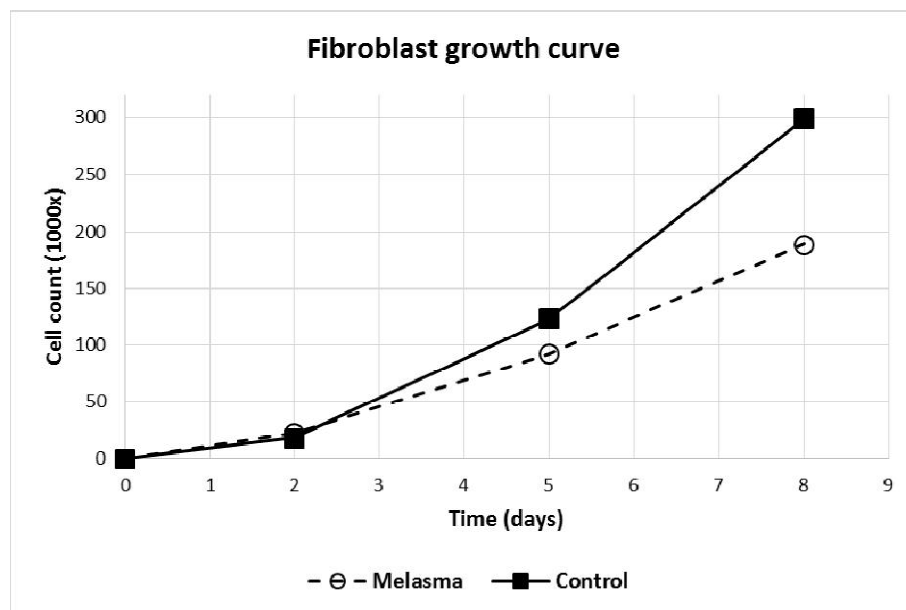
\* mean (standard deviation); \*\* Paired samples Student's t-test; #Mean count per histological field (40x).



**Figure 3.** (A) Melasma: basement membrane discontinuities and poorly demarcated (PAS, 40x). (B) Adjacent skin: well defined basal membrane and its “festoon” appearance (PAS, 40x). (C) Melasma: pendulous melanocytes into the dermis (Melan-A / PAS, 40x). (D) Adjacent skin: normal melanocytes (Melan-A / PAS, 40x).



**Figure 4.** Fibroblast culture from facial melasma (B) and adjacent skin (A) (SA- $\beta$ -gal 100x). Loss of cell aggregation and fusiform shape were prominent in melasma. Histologic sections of melasma (D) and normal adjacent skin (C). Melasma: collagen fragmentation and density reduction at upper dermis (Picrosirius red 20x).



**Figure 5.** Fibroblast growth curve. Mean cell count for patients with facial melasma (n=3).

**Table 2.** Comparison of the gene expression between facial melasma and adjacent skin assessed by real-time PCRarray (n=3).

Gene	Fold Change*	Gene	Fold Change*	Gene	Fold Change*
KITLG	0.96	FGF2	1.06	EDN1	1.22
COL4A1	<b>0.53</b>	IL1A	0.86	EDN3	<b>3.27</b>
COL7A1	0.63	IL1B	0.72	WIF1	1.23
MMP1	<b>1.89</b>	IL6	1.06	WNT5A	0.81
MMP2	0.94	ESR1	1.23	MIF	0.93
MMP7	0.87	ESR2	<b>2.32</b>	HGF	<b>1.53</b>
MMP9	<b>3.09</b>	DKK1	1.03	NRG1	1.08
TIMP1	0.76	DKK3	0.63	VEGFA	1.17
TIMP2	1.08	MAPK14	0.93	SOD1	0.90
TIMP3	0.99	CDH11	0.75	SOD2	1.21
TIMP4	0.70	CCL2	0.73	OXR1	0.95
TP53	1.02	PTGS2	<b>1.51</b>	OXSR1	1.03
GLB1	0.92	CSF2	0.63	WNT3A	No Amplificatio
CDKN2A	0.83	IL17A	No Amplification	POMC	No Amplification

\*<0.5 downregulated, >1.5 upregulated

## Discussion

Melasma pigmentation evolves from a hyperactivity of the whole epidermal melanin unit rather than only a melanocyte hypertrophy. The increased number of cytoplasmic organelles in both basal keratinocytes and melanocytes evidences high epidermal metabolic activity. Prominent mitochondria in melanocytes cytoplasm indicates high ATP production to supply their pathophysiologic needs. Previous studies, also showed, in keratinocytes from melasma skin, alterations in nuclear morphometry, chromatin texture, hyperexpression of estrogen receptors and  $\alpha$ MSH release (3, 21, 22).

Melanogenesis is a complex process mediated by paracrine, autocrine and environmental stimuli (23-26). Phenotypical changes evidenced in melasma skin does not develop primarily and independently from an epidermal disorder since several dermal alterations are manifest. The disruption of basal membrane eases the traffic of dermal cytokines to melanocytes leading to melanin synthesis and delivery through epidermis. Moreover, functional hyperactivity of melanocytes on melasma differs of other hypermelanogenic processes as tanning, freckles, solar lentigines, post-inflammatory hyperpigmentation, *erythema ab igne* or *urticaria pigmentosa* (27, 28).

Basement membrane is synthesized by fibroblasts and keratinocytes. It also plays an important role in maintaining dermal and epidermal homeostasis (29). Lamina densa structural impairment, upper dermal collagen fragmentation and elastotic degeneration discloses an active injury process as the one induced by photoaging where is mediated by dermal MMP and epidermal plasmin (29, 30). In melasma, these alterations are more evident than at the adjacent skin submitted to similar UV exposure regimen. Furthermore, most irradiated facial sites does not coincide to

commoner melasma sites, leading to the hypothesis of some focal tissue predisposition (31, 32).

Numerous microvesicles near the basal membrane were first observed in melasma basal keratinocytes and melanocytes in a greater proportion than adjacent photoexposed skin. These microvesicles content is little known, probably DNA, mRNA and miRNA, but they are commonly found in the granulation tissue from wound healing (33, 34). An *in vitro* study showed that these keratinocytes microvesicles regulate, as exosomes, some genes from fibroblasts, modulating MMP (1 and 3), angiogenesis, thrombospondin and cytokines (IL-6, IL-8 and TGF $\beta$ ) that are related to tissue repair (35). In addition, the hyperexpression of growth factors (e.g. VEGF, bFGF, NGF, HGF and stem cell factor), hypercellularity and endothelial proliferation as evidenced in melasma are also remarkable in tissue healing process (36, 37).

In this study, we identified higher HGF and IL-6 gene expression in fibroblast from melasma, as occurs in wound healing (38, 39). Furthermore, HGF stimulates melanogenesis by its directly melanocyte receptor binding (c-Met) (26), and  $\alpha$ MSH has anti-inflammatory as favors wound healing (40). These findings indicates that the epithelial and dermal repair process can stimulate melanogenesis.

The most important regulator of collagen synthesis and degradation in skin remodeling and repair is dermal fibroblast that interplays with keratinocytes in a paracrine way (37). The role of fibroblast in melasma is not understood, but it is very active in post-inflammatory hyperpigmentation, establishing a cellular network with keratinocyte and melanocyte (41). MMP 2, 3 and 9 degrade collagens IV, laminins and VII, present in lamina densa and anchoring microfilaments (42-44). Meanwhile, in epidermis, urokinase plasmin activator is the major proteases involved in the delay of barrier recover, and acts in synergy to MMPs in UV related basement membrane damage and wound healing (45-47). While MMPs were reported as prominent in melasma dermis, plasmin system was not yet investigated, but tranexamic acid (an inhibitor of plasminogen activator), is reported as effective in melasma improvement (48).

This study disclosed a greater gene expression of MMPs (1, 7 and 9) and a decreased expression of collagen IV (COL4A1) by fibroblast culture isolated from melasma skin biopsies, suggesting the role of degradation of collagen and decreased dermis repair in melasma induced by fibroblast.

Actually, there are some evidence about phenotype differences related to ethnicity and the susceptibility to fibroblast senescence (1, 32, 49). Senescent fibroblasts secrete inflammatory cytokines, bFGF and *stem cell factor*, promotes collagen degradation through MMP activation and have smaller mitotic potential. These issues increase stromal degradation and impair the process of tissue repair, as evidenced in melasma dermis (50).

A skin structural mosaic of tissue susceptibility to senescence can be theorized for melasma development under environmental stimuli like UV radiation and sexual hormones. These expositions would exert a local epigenetic control that lead to focal pigmentation of melasma (51, 52).

Senescent dermal fibroblast phenotype were identified in chronic sun exposed facial skin, and our results disclosed it as prominent in melasma by differences in curve growth and SA- $\beta$ -GAL staining. In addition to lamina densa and upper dermal damage, the greater gene expression of MMPs, IL-6 and lesser expression of collagen IV strength the hypothesis of the involvement of senescent fibroblast in the melasma epithelial mesenchymal interaction (50, 53).

Finally, some genes related to Wnt pathway were changed in melasma. The inhibitory DKK3 is downregulated while WNT3a is hiperexpressed. Meanwhile WNT3a is important to tissue repair, its activation can lead to melanogenesis by direct stimulation to melanocytes (26, 54, 55). Moreover, the activation of estrogen receptors type  $\beta$ , as identified in melasma fibroblasts, can stimulate WNT pathway and explain the prevalence of melasma in women or hyperestrogenic situations (22, 56).

All these findings suggest that melasma can evolve from a chronic damage in upper dermis that interplays an epidermal repair process leading to sustained melanogenesis. The interaction between epidermal melanin unity and upper dermal environment should be explored with the aim to hypothesize an individualized melanogenesis model for melasma based in fibroblast senescence and the activation of WNT pathway.

Further studies should be performed to explore the regulators of those pathways and the cytokine network among keratinocytes, melanocytes, nerve, endothelium and fibroblast in melasma, preferably with primary cell cultures, for genomic, proteomic and functional experiments.

## Conclusion

The prominence of cytoplasmic organelles from melanocytes and keratinocytes evidences the involvement of the whole epidermal melanin unit in melasma. The upper dermis and lamina densa damage suggest the role of dermal injury/repair process in disease pathogenesis. Fibroblast senescence was more noticeable in melasma, leading to an impaired repair and inflammatory response that can promote the focal pigmentary phenotype.

## References:

1. Handel AC, Miot LD, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*. 2014 Sep-Oct;89(5):771-82.
2. Passeron T. Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. *J Eur Acad*

- Dermatol Venereol. 2013 Jan;27 Suppl 1:5-6.
3. Miot LD, Miot HA, Poletini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic changes and the expression of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin-1 receptor in melasma lesions: a comparative study. *Am J Dermatopathol.* 2010 Oct;32(7):676-82.
  4. Rodriguez-Arambula A, Torres-Alvarez B, Cortes-Garcia D, Fuentes-Ahumada C, Castanedo-Cazares JP. CD4, IL-17, and COX-2 Are Associated With Subclinical Inflammation in Malar Melasma. *Am J Dermatopathol.* 2015 Oct;37(10):761-6.
  5. Samaka RM, Bakry OA, Shoeib MA, Zaaza MM. Expression of iNOS and NF-kappaB in melasma: an immunohistochemical study. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2014 Oct;36(5):245-57.
  6. Lee DJ, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Pendulous melanocytes: a characteristic feature of melasma and how it may occur. *Br J Dermatol.* 2012 Mar;166(3):684-6.
  7. Lee AY. Recent progress in melasma pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Nov;28(6):648-60.
  8. Kang HY, Suzuki I, Lee DJ, Ha J, Reiniche P, Aubert J, et al. Transcriptional profiling shows altered expression of wnt pathway- and lipid metabolism-related genes as well as melanogenesis-related genes in melasma. *J Invest Dermatol.* 2011 Aug;131(8):1692-700.
  9. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012 Dec;26(12):1533-7.
  10. Torres-Alvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cazares JP, Fuentes-Ahumada C, Oros-Ovalle C, Navarrete-Solis J, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. *Am J Dermatopathol.* 2011 May;33(3):291-5.
  11. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim JY, Lee ES, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol.* 2006 Jun;154(6):1094-9.
  12. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013;Chapter 14:Unit14 5.
  13. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):671-5.
  14. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001 Aug;23(4):291-9.
  15. Frisch KE, Duenwald-Kuehl SE, Kobayashi H, Chamberlain CS, Lakes RS, Vanderby R, Jr. Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms. *Acta Histochem.* 2012 Feb;114(2):140-4.
  16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
  17. Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics: the bare essentials*: Bc Decker Hamilton, Ontario; 2008.
  18. Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin Chim Acta.* 2006 Apr;366(1-2):112-29.
  19. Mackinnon A. The use and reporting of multiple imputation in medical research—a review. *J Int Med.* 2010;268(6):586-93.
  20. IBM SPSS 22.0 Statistics for Windows Armonk (NY): IBM Corp; 2013.
  21. Brianezi G, Handel AC, Schmitt JV, Miot LD, Miot HA. Changes in nuclear morphology and chromatin texture of basal keratinocytes in melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015 Apr;29(4):809-12.
  22. Tamega Ade A, Miot HA, Moco NP, Silva MG, Marques ME, Miot LD. Gene and protein expression of oestrogen-beta and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosmet Sci.* 2015 Apr;37(2):222-8.
  23. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis\*. *An Bras Dermatol.* 2013 Jan-Feb;88(1):76-83.
  24. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007 Apr;21(4):976-94.
  25. Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res.* 2004 Apr;17(2):96-110.
  26. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors.* 2009 Mar-Apr;35(2):193-9.
  27. Rees J. Genes for freckles. *J Invest Dermatol.* 2004 Aug;123(2):414.
  28. Lee A-Y. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatologica Sinica.* 2014;32(4):233-9.
  29. Amano S. Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009 Aug;14(1):2-7.
  30. Yamamoto O, Bhawan J, Solares G, Tsay AW, Gilchrest BA. Ultrastructural effects of topical tretinoin on dermo-epidermal junction and papillary dermis in photodamaged skin. A controlled study. *Exp Dermatol.* 1995 Jun;4(3):146-54.
  31. Diffey BL, Tate TJ, Davis A. Solar dosimetry of the face: the relationship of natural ultraviolet radiation exposure to basal cell carcinoma localisation. *Phys Med Biol.* 1979 Sep;24(5):931-9.
  32. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013 Feb;27(2):151-6.
  33. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Nov;36(8):888-906.

34. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Apr;91(4):431-7.
35. Huang P, Bi J, Owen GR, Chen W, Rokka A, Koivisto L, et al. Keratinocyte Microvesicles Regulate the Expression of Multiple Genes in Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2015 Dec;135(12):3051-9.
36. Schnickmann S, Camacho-Trullio D, Bissinger M, Eils R, Angel P, Schirmacher P, et al. AP-1-controlled hepatocyte growth factor activation promotes keratinocyte migration via CEACAM1 and urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen receptor. *J Invest Dermatol*. 2009 May;129(5):1140-8.
37. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007 May;127(5):998-1008.
38. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Komminen C, Guriel JL, Sugawara T, et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J*. 2000 Dec;14(15):2525-31.
39. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):835-70.
40. de Souza KS, Cantaruti TA, Azevedo GM, Jr., Galdino DA, Rodrigues CM, Costa RA, et al. Improved cutaneous wound healing after intraperitoneal injection of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Exp Dermatol*. 2015 Mar;24(3):198-203.
41. Cardinali G, Kovacs D, Picardo M. Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo. *Ann Dermatol Venereol*. 2012 Dec;139 Suppl 4:S148-52.
42. Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis*. 1996 Mar;2(1):70-6.
43. Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y, Nishiyama T, Champlaud MF, Burgeson RE, et al. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res*. 2001 Dec 10;271(2):249-62.
44. Amano S, Ogura Y, Akutsu N, Matsunaga Y, Kadoya K, Adachi E, et al. Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process. *Br J Dermatol*. 2005 Dec;153 Suppl 2:37-46.
45. Denda M, Kitamura K, Elias PM, Feingold KR. trans-4-(Aminomethyl)cyclohexane carboxylic acid (T-AMCHA), an anti-fibrinolytic agent, accelerates barrier recovery and prevents the epidermal hyperplasia induced by epidermal injury in hairless mice and humans. *J Invest Dermatol*. 1997 Jul;109(1):84-90.
46. Ogura Y, Matsunaga Y, Nishiyama T, Amano S. Plasmin induces degradation and dysfunction of laminin 332 (laminin 5) and impaired assembly of basement membrane at the dermal-epidermal junction. *Br J Dermatol*. 2008 Jul;159(1):49-60.
47. Grondahl-Hansen J, Lund LR, Ralfkiaer E, Ottevanger V, Dano K. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest Dermatol*. 1988 Jun;90(6):790-5.
48. Li Y, Sun Q, He Z, Fu L, He C, Yan Y. Treatment of melasma with oral administration of compound tranexamic acid: a preliminary clinical trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Mar;28(3):393-4.
49. Chang EA, Tomov ML, Suhr ST, Luo J, Olmsted ZT, Paluh JL, et al. Derivation of Ethnically Diverse Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Sci Rep*. 2015;5:15234.
50. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010 Nov 15;24(22):2463-79.
51. Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol Med*. 2010 Jan;16(1):7-16.
52. Gronniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Stab F, Wenck H, et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet*. 2010 May;6(5):e1000971.
53. Ogura N, Matsuda U, Tanaka F, Shibata Y, Takiguchi H, Abiko Y. In vitro senescence enhances IL-6 production in human gingival fibroblasts induced by lipopolysaccharide from *Campylobacter rectus*. *Mech Ageing Dev*. 1996 May 24;87(1):47-59.
54. Park TJ, Kim M, Kim H, Park SY, Park KC, Ortonne JP, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 promotes melanogenesis in normal human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jan;27(1):72-81.
55. Luscan A, Shackelford G, Maslah-Planchon J, Laurendeau I, Ortonne N, Varin J, et al. The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):358-71.
56. Yao PL, Gonzalez FJ, Peters JM. Targeting estrogen receptor-beta for the prevention of nonmelanoma skin cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014 Feb;7(2):182-5.

## 6. Conclusões

1. Queratinócitos basais da pele com melasma apresentam alterações morfométricas nucleares e da textura da cromatina, sugerindo envolvimento dessas células na patogênese da doença.
2. A hiperpigmentação melânica no melasma não apresenta características de ativação da via induzida por radiação ultravioleta dependente de p53, da síntese de prostaglandinas epidérmicas (dependente de COX2), dano epitelial (p38) ou inflamação aguda (IL1 $\alpha$ ).
  - 2.1. A hipersecreção de MSH pelos queratinócitos e melanócitos, além da hiperexpressão epitelial de MC1R podem ocorrer em resposta a estímulo inflamatório externo à epiderme.
3. Foi identificado dano estrutural na derme superior predominantemente no melasma, fragmentação das fibras do colágeno, além de interrupção da integridade da lâmina basal.
  - 3.1. A protusão de melanócitos para a derme superficial (melanócitos em pêndulo) foi mais frequente no melasma, evidenciando desestruturação da lâmina basal, o que pode favorecer o trânsito de citocinas de origem dérmica para a camada basal da epiderme.
4. Queratinócitos basais e melanócitos apresentaram hiperplasia de organelas, sugerindo participação de ambos grupos celulares na doença.
  - 4.1. Rupturas da integridade, delaminações e alterações estruturais da lâmina densa foram mais prevalentes no melasma, sugerindo intenso processo de dano à derme superior.
  - 4.2. A maior expressão de microvesículas intraqueratinocíticas e intramelanocíticas, adjacentes à membrana basal e às rupturas da lâmina densa e filamentos de ancoragem indicam a atividade do sistema de reparo epitelial frente ao processo de lesão na derme superior predominantes no melasma.
5. Fibroblastos do melasma apresentaram marcadores fenotípicos de senescência e expressaram genes relacionados à maior degradação da matriz extracelular (MMP 1, 7 e 9), fatores pró-inflamatórios (IL-6 e CCL2) e fatores de crescimento (HGF e WNT3a) que podem levar à melanogênese por estímulo direto ao melanócito.

## 7. Perspectivas

Melasma é queixa comum na prática dermatológica, e, até o momento, os tratamentos são voltados, especialmente, à inibição da síntese e distribuição de melanina. Como os tratamentos não agem na patogênese da doença, podem levar a falhas terapêuticas e recidivas. Esse aspecto, associado ao acometimento de áreas visíveis, curso crônico, em, principalmente, mulheres durante o menacme, inflige importante impacto na qualidade de vida. Todos esses elementos nos motivam a aprofundar o estudo da epidemiologia, clínica, terapêutica e fisiopatologia da doença.

A pesquisa sobre a gênese do melasma vem tomando rumos intrigantes. À medida que se investigam as vias de pigmentação, genética e o efeito dos fatores ambientais na doença; emergem, não somente novos conceitos sobre pigmentação melânica, mas também, dúvidas sobre sua regulação. Nosso estudo contribuiu para maior conhecimento dos aspectos regulatórios e estruturais envolvidos, sugerindo a participação de queratinócitos e fibroblastos, além de um mecanismo de dano / reparo dérmico na fisiopatologia da doença. Estamos conduzindo um estudo proteômico comparativo entre as peles faciais, que deve subsidiar com maior precisão, as vias de melanogênese e o padrão de peptídeos envolvidos no melasma.

A hipermelanização simétrica, secundária à hipertrofia melanocítica local, não coincidente com as áreas mais irradiadas pela exposição solar da face é um dos grandes paradoxos da patogênese do melasma. O modelo proposto neste trabalho, que teoriza a senescência fibroblástica manifestada em mosaico na pele, induzida por elementos exógenos, e participação de controle epigenético, deve ser explorado para que se desvendem quais genes e suas regulações estejam supostamente alterados no melasma.

Investigações posteriores devem amostrar simultaneamente pele com melasma, adjacente e pele fotoprotégida, como retroauticular. As alterações decorrentes do fotoenvelhecimento facial levam a certa dificuldade de individualização dos fenômenos. Nosso grupo está conduzindo uma investigação que envolva essa metodologia e, explore outras vias de regulação da pigmentação como AGOUTI, WNT e IL-1.

O sequenciamento genético e a identificação de mutações ao DNA, em culturas isoladas de queratinócitos, melanócitos e fibroblastos, comparativamente, entre a pele com melasma e adjacente, deve dar luz às alterações genéticas e epigenéticas subjacentes a esses fenótipos. Em estudos recentes que exploraram o genoma da pele com melasma e pele sã adjacente, os pesquisadores o fizeram a partir de biópsias de pele total, que amostram, em uma proporção muito superior, os queratinócitos, em detrimento aos melanócitos, fibroblastos, endotélio e células

inflamatórias; o que limita a validade dos resultados para essas populações minoritárias.

Caso se confirmem as mutações em mosaico dos fibroblastos, ou de outros grupos celulares, o processo indutor de mutação precisa ser elucidado, se germinativo ou somático. Um mecanismo discutido no mosaicismo epigenético seria a incorporação de material viral ao DNA, perda de heterozigose e, especialmente, retrotransposons, ocasionando ativação ou silenciamento de um gene. Todos esses fenômenos já foram descritos em humanos e a RUV poderia ser o indutor/promotor, como ocorre na carcinogênese cutânea.

Posteriormente, um modelo epidemiológico para estudo da hipótese do mosaico baseado na miscigenação racial pode ser idealizado a partir do exame dermatológico de adultos provenientes de populações isoladas, geneticamente não miscigenadas, como quilombolas, tribos indígenas e comunidades de pomerânios; cuja prevalência da doença deva ser menor que nas populações urbanizadas miscigenadas.

Áreas de melasma que regrediram espontaneamente foram identificadas em 12% dos pacientes; ou, como ocorre no ano subsequente ao parto, em 6% dos casos induzidos pela gestação. Esses grupos também podem fornecer modelos para explorar fatores ambientais e os genes regulatórios da doença.

O estudo de anatomia comparada em animais que modificam sua pigmentação durante o ciclo vital (p.ex.: cavalos tordilhos, appaloosas e pampas), que apresentem mosaicos pigmentares (p.ex.: onça-pintada), ou da própria filogenética da pigmentação em mamíferos podem substanciar modelos que expliquem as diferenças fenotípicas encontradas no melasma.

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

Cosméticos também são apontados como desencadeantes do melasma. Estudos com desenhos mais detalhados e investigação específica a partir de *patch-tests* nesses pacientes, contribuiriam para avaliar o real impacto desses produtos sobre a pele susceptível e as principais substâncias envolvidas.

Componentes ambientais devem ser explorados na patogênese do melasma. Xenoestrógenos são substâncias que se comportam como estrogênio, embora diferentes quimicamente de substâncias naturalmente estrogênicas produzidas pelo organismo. Alguns exemplos são os parabenos utilizados em loções, 4-metilbenzilideno cânfora (cremes protetores solares), hidroxianisol butilado (conservante de alimentos). O estudo dos xenoestrógenos sobre os

genes da pigmentação e também sobre a unidade epidermo-melânica seria importante, já que queratinócitos da pele com melasma apresentam maior expressão de receptores de estrogênio.

A investigação da segregação da doença nas famílias pode indicar o perfil de componente genético envolvido, se um ou mais genes, e se seguem comportamento mendeliano (p.ex: autossômico dominante), ou multifatorial.

O conhecimento de genes específicos alterados diretamente na pele com melasma poderia sinalizar uma opção terapêutica definitiva a partir da terapia gênica, do controle epigenético por drogas, interferência em vias não canônicas da pigmentação ou técnicas de remoção e reparo do tecido afetado. Abordagens cirúrgicas, como a dermoabrasão ou microagulhamento podem estimular o reparo da derme superficial e a proliferação de fibroblastos não senescentes. O transplante autólogo de fibroblastos pode induzir o repovoamento da derme papilar, reparando os danos induzidos pelos fibroblastos senescentes. Finalmente, drogas que tenham potencial de inibição de metaloproteinases, como a sinvastatina, ácido tranexâmico, antioxidantes e doxiciclina podem substanciar o processo de reparo e levar a respostas terapêuticas sustentadas.

A incidência do melasma parece ter aumentado nos últimos anos, o que pode se dever a elementos externos, como a crescente exposição solar no lazer, a prática de esportes ao ar livre, em deslocamentos (automóvel e transporte público), uso precoce e frequente de contraceptivos orais, cosméticos alergizantes, inibidores da recaptção de serotonina e a miscigenação da população. Se essas hipóteses estiverem corretas, espera-se um progressivo aumento da sua incidência. Estamos conduzindo uma investigação dos diagnósticos de casos novos no serviço de referência, com intervalo de uma geração, para dimensionar essa tendência epidemiológica.

Do ponto de vista da prevenção primária, tornam-se cada vez mais importantes medidas sanitárias baseadas em grupos de risco: mulheres jovens, uso de CHO, gestantes, familiares de primeiro grau com melasma, áreas de grande irradiação solar e populações miscigenadas. O incentivo a ações efetivas em adolescentes com perfil de risco para a doença, como a fotoproteção rigorosa, evitação da exposição a hormônios sexuais exógenos, estratégias para redução do estresse e tratamento precoce podem contribuir na redução da incidência ou da gravidade da doença.

Nossos resultados preliminares são intrigantes e motivadores para a persistência investigativa quanto aos mecanismos de controle da melanogênese alterados na pele afetada pelo melasma. Esperamos que prospectem o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que beneficiem milhares de pacientes aflitos.

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Título da pesquisa:** Avaliação morfofuncional e genômica de cultura de melanócitos de pacientes com melasma facial

**Nome da instituição:** Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP campus Botucatu, SP

**Nome dos Pesquisadores:** Ms. Gabrielli Brianezi e Prof. Dr. Hélio Amante Miot (Coordenador)

Convido a Senhora, \_\_\_\_\_ a participar de uma pesquisa chamada “**Avaliação morfofuncional e genômica de cultura de melanócitos de pacientes com melasma facial**”.

A pesquisa consta da realização de uma biópsia da pele, com anestesia local. A anestesia é semelhante à realizada em consultório odontológico, e se caracteriza pela injeção na pele de um líquido anestésico, utilizando agulha fina. A dor da anestesia é leve e transitória. Logo após a anestesia, serão removidos quatro fragmentos de 3 milímetros de diâmetro da pele da face, sendo dois da pele lesada com melasma e dois da pele sã adjacente localizadas na parte mais periférica do rosto (lateral). Após o procedimento de biópsia será realizada uma delicada sutura do local. Há possibilidade de resultar em cicatriz visível. Os pontos serão retirados no próprio ambulatório após sete dias. Seu nome e outros dados não serão divulgados. Serão realizadas fotografias do procedimento e lesão como arquivo para a pesquisa. A realização de biópsias não é um procedimento necessário para o tratamento do melasma, e não trará benefícios e mudanças no procedimento terapêutico imediatas ao início da pesquisa. Porém sua participação no projeto ajudará com a pesquisa para melhor compreensão dos mecanismos que levam ao surgimento e manutenção da doença e uma possível melhora no tipo de tratamento utilizado. O fragmento retirado da biópsia será somente utilizado neste projeto, caso uma nova pesquisa no mesmo fragmento retirado seja necessária será solicitada nova autorização. O melasma é uma doença de pele que afeta a pigmentação de certas regiões, principalmente face, fronte e têmporas. É caracterizada por manchas acastanhadas que pode estar associada com exposição ao sol, influência genética, gravidez, contraceptivos orais, alguns cosméticos, fatores endócrinos, disfunção tireoidiana e medicamentos. Neste estudo serão feitas culturas de células com os fragmentos de pele retirados pela biópsia, o que auxiliará no entendimento do funcionamento do melasma, que ainda permanece desconhecido, será possível ainda estudar a influência dos possíveis fatores que podem causar o aparecimento da doença e estabelecer uma melhor análise dos possíveis tratamentos. Espera-se que, com esse conhecimento, possa se compreender melhor as interações que acontecem a nível celular na pele, com as possíveis funções de cada tipo celular da epiderme e sua interação com a derme. Possibilitando o emprego de novas estratégias de tratamento e diminuição de recidivas do melasma. Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos. Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e não terá nenhuma desvantagem. Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.

Caso você precise de orientação ou esclarecimentos, deve procurar o responsável pela pesquisa, Dr. Hélio Amante Miot, no departamento de Dermatologia da UNESP Botucatu, fone (14) 3882-4922.

#### CONCORDO EMPARTICIPAR DA PESQUISA

Sujeito da Pesquisa: .....

Assinatura: .....

Data:..... / ..... / .....

Gabrielli Brianezi  
Assinatura

---

Prof. Hélio Amante Miot  
R. Manoel Fernandes Cardoso, 790, casa 4.  
Botucatu – SP  
Telefone: 3813 4727  
E-mail: [heliomiot@fmb.unesp.br](mailto:heliomiot@fmb.unesp.br)

---

Gabrielli Brianezi  
R. Primo Paganini, 990, casa B, Jd. Panorama  
Botucatu – SP  
Telefone: (19) 99766 5232 ou (14) 3811 6238 ramal 252  
E-mail: [gabrielli.brianezi@hotmail.com](mailto:gabrielli.brianezi@hotmail.com) ou [gabibrianezi@yahoo.com.br](mailto:gabibrianezi@yahoo.com.br)

## 8.2. Anexo 2: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

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



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de outubro de 2011.

Of. 461/2011 CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Hélio Amante Miot  
Departamento de Dermatologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Prof. Hélio,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 3973-2011) "Avaliação morfofuncional e genômica de cultura de melanócitos de pacientes com melasma facial", a ser conduzido por Gabrielli Brianezi, orientada por Vossa Senhoria, Coorientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariângela Esther Alencar Marques, com a colaboração de Andréia de Almeida Tamega, Luciane Donida Bártoli Miot, Silvy Stuchi Maria Engler, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 03/10/2011.

**O CEP SOLICITA RELATÓRIO DETALHADO DE ATIVIDADES APÓS INCLUSÃO DOS 3 PRIMEIROS PACIENTES.**

Situação do Projeto: **APROVADO** Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.

### 8.3. Anexo 3: Macro para automatização da análise de intensidade da fluorescência

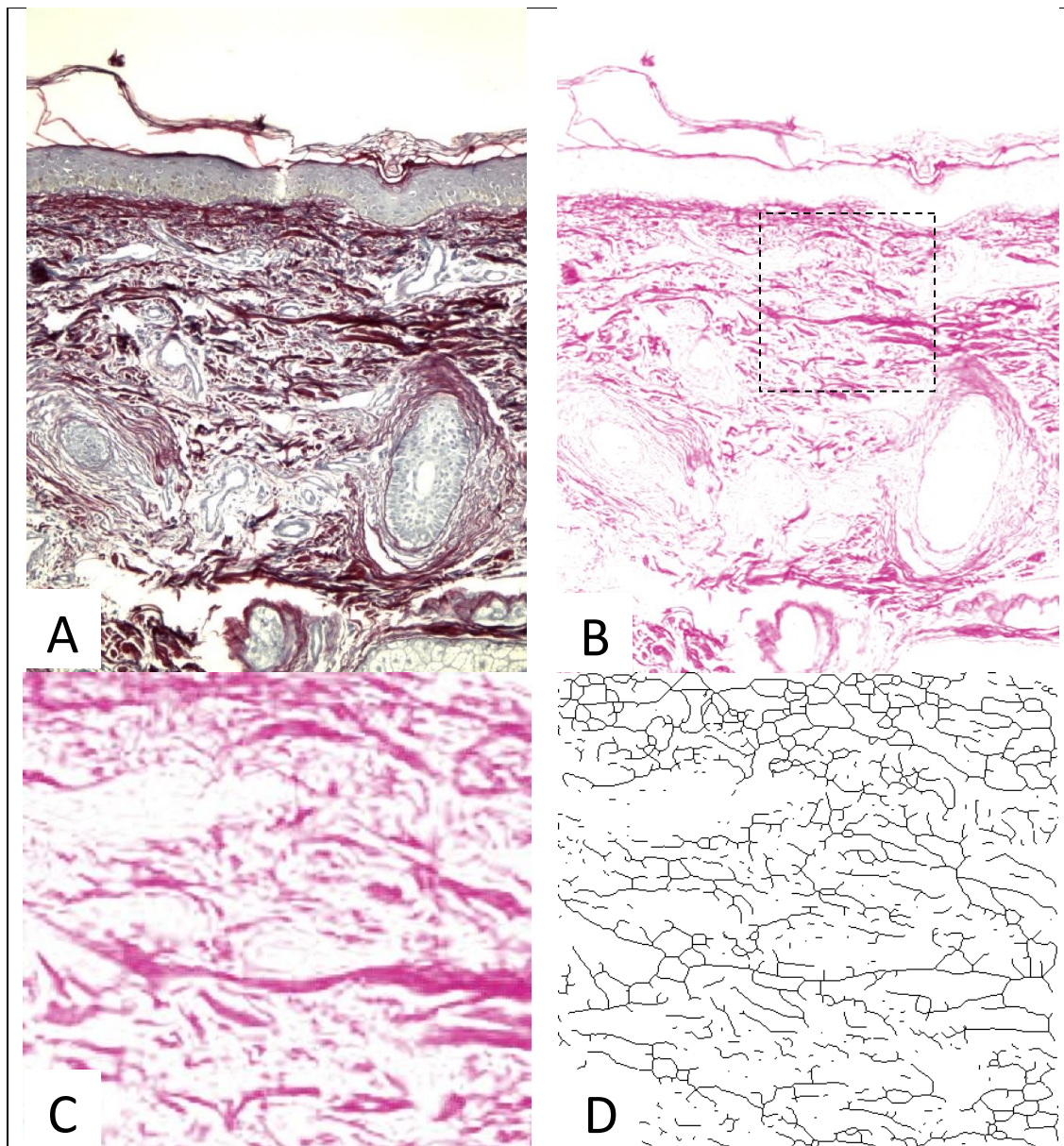
```
macro "melanocyte segmentation [1]" {  
  run("8-bit");  
  run("Enhance Contrast...", "saturated=1");  
  run("Maximum...", "radius=10");  
  setAutoThreshold("Default");  
  //run("Threshold...");  
  setAutoThreshold("Triangle");  
  setOption("BlackBackground", true);  
  run("Convert to Mask");  
  setTool("wand");  
}  
  
macro "stack [2]" {  
  run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");  
}  
  
macro "measure [3]" {  
  run("Measure");  
}
```

#### 8.4. Anexo 4: Macro para automatização da análise fractal do colágeno (ImageJ)

```
macro "Processa[1]" {  
  run("Select All");  
  run("Colour Deconvolution", "vectors=[FastRedFastBlue DAB] hide");  
  selectImage(3);  
  close();  
  selectImage(3);  
  close();  
  selectImage(1);  
  close();  
  run("Make Binary");  
  run("Skeletonize");  
  //setTool("rectangle");  
  makeRectangle(24, 393, 930, 210);  
}
```

```
macro "Analisa[2]" {  
  run("Crop");  
  run("Fractal Box Count...", "box=2,3,4,6,8,12,16,32,64");  
}
```

#### 8.4.1. Representação do processamento de imagem para a análise da dimensão fractal.



**Figura 8.4.1.** Representação do processamento de imagem para análise da dimensão fractal. A. Imagem original. B. Deconvolução por cores. C Área de interesse da derme superficial. D. Área binarizada e esqueletonizada.