



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

Maria Paula Barbieri D’Elia

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ANCESTRALIDADE EM
MULHERES COM MELASMA FACIAL: UM ESTUDO
TRANSVERSAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu

2015

Maria Paula Barbieri D'Elia

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ANCESTRALIDADE EM
MULHERES COM MELASMA FACIAL: UM ESTUDO
TRANSVERSAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu

2015

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

D'Elia, Maria Paula Barbieri. Avaliação comparativa da ancestralidade em mulheres com melasma facial: um estudo transversal / Maria Paula Barbieri D'Elia. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Hélio Amante Miot
Capes: 40101029

1. Distúrbios de pigmentação da pele. 2. Melanose. 3. Hereditariedade. 3. Linhagem (Genética). 4. Anticoncepcionais.

Palavras-chave: Grupo com Ancestrais do Continente Africano; Grupo com Ancestrais do Continente Europeu; Melasma; Mutação INDEL; Pigmentação da Pele.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Hélio Amante Miot, por toda sua dedicação e entusiasmo, e por me incentivar nos momentos de angústias e dúvidas. Agradeço todos os ensinamentos e o tempo dedicado.

À Dra. Luciane Donida Bartoli Miot, por disponibilizar seu ambulatório para a realização desse projeto e contribuir na elaboração deste trabalho.

À Dra. Márcia Guimarães da Silva do Departamento de Patologia, por disponibilizar seu laboratório e pelo apoio recebido.

À médica residente Marcela Calixto Brandão pelo auxílio na coleta dos questionários e amostras, sempre animada e disposta a ajudar a qualquer momento.

À doutoranda Bruna Ribeiro de Andrade Ramos que me auxiliou nas atividades realizadas no laboratório, pela paciência e disponibilidade.

Ao Dr. Sidney Emanuel Batista Santos pelo acolhimento em Belém do Pará e pela possibilidade da realização desse trabalho em equipe. Também ao funcionário do Laboratório de Genética, UFPA, Marcos Antônio Trindade Amador que auxiliou na genotipagem das amostras, pelo seu tempo e paciência.

À Eliete Soares, pelas fotografias que contribuíram para a elaboração da aula e do trabalho.

Aos docentes, médicos, residentes e funcionários do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho, apoio e incentivo.

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

Aos pacientes e voluntários, que com sua colaboração, tornaram possível a realização deste estudo.

Agradeço a Deus por me iluminar e me guiar por caminhos certos, que Ele continue sempre ao meu lado.

Dedicatória

Ao meu noivo, Carlos Eduardo, por todo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho, e que com certeza estará sempre comigo em todos os projetos da minha vida

Aos meus pais e meus irmãos, pelo amor, carinho e todos os ensinamentos recebidos durante minha vida. Por me incentivarem sempre nos estudos e me proporcionarem a melhor formação profissional e pessoal.

Amo vocês!

Trabalho realizado no ambulatório do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp, no Laboratório Materno Fetal do Departamento de Patologia da FMB-Unesp e no Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA.

Sumário

Índice de abreviaturas	12
Resumo	13
1. REVISÃO DA LITERATURA	15
Melasma	15
Origem do homem atual e os principais grupos populacionais	31
Ancestralidade da População Brasileira	35
Avaliação da ancestralidade genética	41
Referências	44
2. OBJETIVOS	48
3. ARTIGO.....	49
4. CONCLUSÕES	72
5. PERSPECTIVAS.....	73
6. APÊNDICES.....	79
7. ANEXOS	99

Índice de abreviaturas

- α -MSH – Hormônio estimulador de melanócito tipo alfa
ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico
AIM – Marcador informativo de ancestralidade
ASIP – Proteína sinalizadora *agouti*
AUC – Área sob a curva
CHO – Contraceptivo hormonal oral
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ER – Receptor de estrógeno
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico
EUA – Estados Unidos da América
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC 95% – Intervalo de confiança de 95%
INDEL – Polimorfismo de inserção/deleção
LGHM – Laboratório de Genética Humana e Médica
MC1-R – Receptor de melanocortina tipo 1
OPRM-1 – Receptor opioide mu-1
OR – Razão de chances
PCR – Reação em cadeia de polimerase
POMC – Proopiomelanocortina
ROC – Característica de operação do receptor
RUV – Radiação ultravioleta
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
STC – Fator de células tronco
TRH – Terapia de reposição hormonal
TRP-1 e TRP-2 – Proteínas relacionadas à tirosinase tipo 1 e 2
UFPA – Universidade Federal do Pará
UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

Resumo

O melasma é uma hipermelanose focal e adquirida de curso crônico que afeta áreas fotoexpostas, especialmente, de mulheres em idade fértil. Diversos fatores contribuem para seu desenvolvimento: exposição solar, esteroides sexuais, medicamentos e história familiar. Recentemente, ancestralidade referida foi apontada como outro fator de risco. E este fato incentivou a investigação da ancestralidade relacionada ao melasma.

O principal objetivo desse projeto foi avaliar a associação entre a ancestralidade genética e o melasma facial.

Foi realizado um estudo transversal envolvendo mulheres portadoras de melasma facial e seu grupo controle, pareado por idade, entre pacientes do Hospital das Clínicas, FMB-Unesp, Botucatu (Brasil). Foram excluídos descendentes de asiáticos, portadores de outras dermatoses faciais e fototipos extremos (I e VI).

Após inquérito de dados clínicos e demográficos, foi coletado *swab* da mucosa oral para posterior extração de DNA, e a partir deste material, realizada avaliação da ancestralidade genética por estudo de marcadores informativos de ancestralidade do tipo INDEL.

Foram avaliadas 119 mulheres com melasma facial e seus 119 controles. A idade média do início do melasma ocorreu aos 27 ± 8 anos. Gestação (40%), exposição solar (37%) e contraceptivo oral hormonal (22%) foram os fatores mais frequentemente relatados como desencadeantes. Todos os sujeitos apresentaram algum grau de miscigenação quanto à ancestralidade genética. Os componentes

genéticos africano e europeu diferiram significativamente entre casos e controles (10% vs 6%; 77% vs 82%; $p < 0,05$). O percentual de ancestralidade africana (OR=1,04), história familiar de primeiro grau (OR=3,04), baixa escolaridade (OR=4,04) e uso de antidepressivos entre indivíduos com familiares acometidos pelo melasma (OR=6,15) associaram-se à doença, independentemente dos demais fatores de risco conhecidos.

Concluiu-se que houve associação entre o componente ancestral genético africano e melasma facial em mulheres brasileiras e fototipo III a V.

Palavras-chave: Anticoncepcionais, Estudos Transversais, Gravidez, Grupo com Ancestrais do Continente Africano, Grupo com Ancestrais do Continente Europeu, Grupo com Ancestrais Nativos do Continente Americano, Linhagem, Melasma, Mutação INDEL, Pigmentação da pele, Transtornos de pigmentação.

1. REVISÃO DA LITERATURA

Melasma

Melasma é uma hipermelanose localizada, comum, adquirida e de curso crônico. Afeta áreas fotoexpostas, principalmente a face, mulheres na menacme, e fototipos intermediários (III a V de Fitzpatrick).^{1,2}

Caracteriza-se por máculas acastanhadas e simétricas de bordas irregulares, de contornos nítidos, com predileção pela região zigomática, frontal, labial superior, nasal e mentoniana. Mais raramente, acomete região cervical, braços e porção anterior do tórax (figuras 1 e 2).^{3,4}

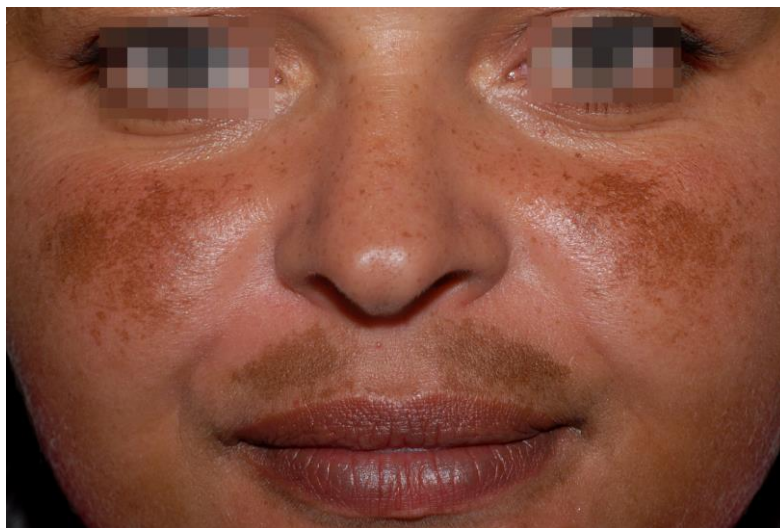


Figura 1. Melasma centrofacial. Acometimento da região zigomática e lábio superior por máculas hipercrômicas acastanhadas.



Figura 2. Melasma extrafacial. Acometimento do segmento superior e anterior do tórax por mácula hiperocrômica acastanhada.

Apesar de ser assintomático, melasma tem curso crônico e afeta áreas visíveis de pacientes em idade fértil, infligindo importante impacto à qualidade de vida, limitando suas relações sociais, rebaixando a autoestima e promovendo sentimentos depressivos.⁵

Não é conhecida a exata incidência populacional do melasma, assim como não se comprovou se houve alguma modificação, nas últimas décadas, devido ao aumento gradual da exposição solar no lazer, nas atividades diárias da população e uso precoce, além de frequente, de contraceptivos orais.^{6,7}

Melasma representa uma importante demanda para o atendimento dermatológico. Em 2006, as doenças da pigmentação (Código L81) foram a terceira causa de consulta dermatológica de acordo com censo realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia, cerca de 8,4% do total, variando conforme sexo, idade e região do País.⁸

A intensa miscigenação populacional do Brasil, que gerou grande número de indivíduos com fototipos intermediários, e a localização geográfica de alta incidência de radiação ultravioleta (RUV) favorecem o desenvolvimento da doença no País. Estima-se que, entre 15 e 35% das mulheres brasileiras adultas sejam acometidas pelo melasma.⁹

Há grande variação na prevalência do melasma mundialmente, mas a razão disso não é completamente compreendida. No Sul dos Estados Unidos da América (EUA), apenas 8,8% das mulheres latinas foram identificadas com a doença. Já, no Sudeste asiático, foram observadas prevalências de até 40% das mulheres acometidas.^{1,10}

Existe também importante diferença na proporção de casos entre mulheres e homens, estimada em 9-10:1. Um estudo indiano identificou uma relação menos expressiva (6:1); já, no Brasil e em Cingapura, houve predominâncias mais notáveis, 39:1 e 21:1.¹¹⁻¹³

Em estudo envolvendo 515 adultos trabalhadores do campus universitário da Unesp de Botucatu, SP (Brasil), identificou-se melasma em 34% das mulheres e 6% dos homens.⁹

Outro estudo, no Sudeste asiático, revelou 20% dos homens de uma população acometidos.¹⁰ Já em um trabalho indiano, uma proporção ainda maior de homens foi identificada, entre 120 pacientes com melasma, 25,8% eram homens. Associa-se a isso o fato da população apresentar fototipos mais altos, 58,1% serem trabalhadores de áreas externas (expostos ao sol), grande parte do país situar-se em latitudes intertropicais e o hábito de usar óleos vegetais (p.ex. óleo de mostarda) após o banho, associado à exposição solar.¹⁴

Melasma é mais prevalente (cerca de 90%) em indivíduos de fototipos intermediários (Fitzpatrick III a V).¹⁵ Teoriza-se que indivíduos de fototipo I não consigam induzir pigmentação adicional e os de fototipo VI já a produzam com máxima eficiência, caracterizando fenótipos de pigmentação mais estáveis. Isso também se evidencia pelo pequeno número de casos de melasma na população europeia, com fototipos predominantemente baixos, e entre negroides da África subsaariana, com intensa pigmentação cutânea. Além disso, fototipos extremos são menos evidentes em populações miscigenadas. A influência da ancestralidade em populações altamente miscigenadas, como a brasileira, não foi ainda estudada de forma adequada quanto à incidência da doença.⁶

A etiologia do melasma ainda não foi esclarecida, porém, múltiplos fatores foram descritos como desencadeantes ou agravantes da doença, como: exposição solar, uso de contraceptivo hormonal oral (CHO), terapia de reposição hormonal, cosméticos, medicamentos fotossensibilizantes, gestação e estresse psicológico. Além desses fatores, a predisposição genética, caracterizada pelo acometimento familiar de primeiro grau, é frequentemente referido entre os pacientes.^{6,16}

A exposição solar é o principal fator de risco do melasma, exercendo papel tanto no surgimento como na piora e manutenção do quadro. Em estudo brasileiro com 302 pacientes com melasma facial, 48,5% referiam exposição solar intensa como fator desencadeante.⁴ Da mesma forma, atividades profissionais e de lazer com exposição ao sol também foram mais prevalentes em pacientes com melasma do que em controles do mesmo sexo e faixa etária.¹⁶

Estímulos hormonais, especialmente esteroides sexuais, como uso de CHO, terapia de reposição hormonal e gravidez são classicamente relacionados ao melasma.⁶ Estrógenos ativam receptores intracelulares proteicos específicos para esses hormônios, os receptores de estrógeno (ER) alfa e beta.

Os melanócitos e queratinócitos expressam ER, sendo predominante o ER beta. O estradiol aumenta os níveis de proteínas relacionadas à tirosinase 2 (TRP-2) em melanócitos normais,¹⁷ aumenta também a vascularização, a atividade de pigmentação celular e os níveis de RNAm do receptor de melanocortina tipo 1 (MC1-R), o que poderia exercer grande papel na pigmentação da pele e consequentemente no desenvolvimento do melasma. Porém, este mecanismo ainda não foi totalmente elucidado.¹⁸

Quanto à progesterona, seu papel ainda é conflitante. Alguns estudos demonstram que ela aumenta o número de melanócitos e a atividade da tirosinase, enquanto outros reportaram efeito inibitório sobre cultura de células.¹⁸

Tanto ER quanto receptores de progesterona são mais expressos no epitélio com melasma do que na pele sã adjacente.¹⁸

O uso de CHO é classicamente associado ao desenvolvimento do melasma. Estas drogas podem induzir hiperpigmentação facial com difícil desaparecimento após a suspensão do contraceptivo. Apesar disso, um relato de quatro mulheres cujo melasma melhorou espontaneamente após troca do método contraceptivo de CHO por dispositivo intra-uterino, indica potencial benefício de indicar sua suspensão em pacientes com melasma refratário ao tratamento.¹⁹

Em estudo brasileiro com 302 mulheres portadoras de melasma facial, 38,1% delas relataram uso atual de CHO, e 16,2% (do total) relacionaram CHO como fator desencadeante da doença.⁴ Dados de outro estudo nos EUA, com 212 pacientes em uso de CHO, revelam que 29% desenvolveram o melasma durante seu uso.²⁰

Desde os relatos hipocráticos a gestação é relacionada ao melasma, antigamente chamado de máscara gravídica ou cloasma.⁶ A gravidez parece induzir mais precocemente o melasma nas pacientes e, quanto maior o número de gestações, mais comum o desenvolvimento das lesões.⁴

Estudo brasileiro com 953 pacientes com melasma, a maioria (97,5%) mulheres, evidenciou que 83,2% reportaram pelo menos uma gestação, e 29,2% dessas tiveram esse fator como desencadeante da lesão.¹¹ Outro estudo no Sul do Brasil, com 224 gestantes apresentou 10,7% de pacientes com melasma.²¹ E outra investigação com 207 casos e seus controles, que pesquisou os fatores de risco para o melasma, mostrou que 79% dos casos já haviam gestado, e 53% relataram a lesão desencadeada pela gravidez.¹⁶

A gestação foi relatada como causa do melasma em 36,4% dos casos em estudo brasileiro com mais de 300 pacientes.⁴ Já outra publicação iraniana, envolvendo 400 gestantes, demonstrou significância estatística proporcionalmente positiva entre melasma e número de gestações, 15,8% delas apresentavam melasma facial.²²

Estudo controlado brasileiro, em 2014, demonstrou associação independente de melasma com gestação e com tempo de uso de CHO.¹⁶

Outros esteroides exógenos já foram também implicados como desencadeantes de melasma em idades mais tardias (p.ex. mulheres sob terapia de reposição hormonal).⁶ Os dados relacionados à reposição hormonal e aparecimento de melasma em mulheres menopausadas são controversos, apesar de favorecerem o desenvolvimento de formas extrafaciais.²³

Nos últimos anos, o uso de cosméticos para o cuidado da pele vem aumentando em todo o mundo, estes produtos foram também apontados como desencadeantes de melasma. Um inquérito brasileiro, com 302 mulheres com melasma, evidenciou 3,3% dos casos induzidos por cosméticos.⁴

Não são incomuns reações alérgicas de contato e de fotossensibilidade por cosméticos na população. Uma investigação brasileira de 76 pacientes com queixa de alteração da pele devido ao uso de cosméticos mostrou que melasma, dermatite de contato e acne eram as queixas mais frequentemente relacionadas aos produtos estudados; entretanto, apenas 31% desses pacientes tiveram sua lesão comprovadamente associada a cosméticos.²⁴

Várias substâncias (colofônio, bálsamo do Peru, lanolina, formaldeído, fragrâncias, óleo de rosas, triclosan e cetrimida) foram relacionadas como causa de irritação primária, dermatite de contato alérgica, dermatite de contato fotoalérgica, urticária de contato, alteração da pigmentação da pele e fotossensibilidade.²⁴ Pigmentação decorrente de dermatite de contato a cosméticos deve ser considerada como possível fator etiológico do melasma quando este não está associado aos fatores clássicos como gestação, uso de CHO e exposição solar. Em estudo indiano com 67 pacientes com melasma

identificou-se positividade no teste de contato alérgico para cosméticos em 43% dos indivíduos, contra uma expectativa de 29-36% na população geral.²⁵

A inflamação decorrente da dermatite de contato pode perpetuar quadros de hiperpigmentação pós-inflamatória explicando a cronicidade do melasma em alguns casos. Ainda, pode-se questionar se tais casos diagnosticados clinicamente como melasma pelo padrão de hiperpigmentação e localização na face, sejam reações pigmentares crônicas pós-inflamatórias. Estudos que explorem esses subgrupos devem ser conduzidos com enfoque clínico, patológico e terapêutico.²⁵

Algumas medicações orais foram apontadas no surgimento do melasma como fenotiazinas e anticonvulsivantes. O uso destas medicações por períodos prolongados pode provocar fotossensibilidade, aumento da pigmentação melânica e piora do melasma.²⁶

Estados ansiosos ou estressantes parecem ter influência no melasma, havendo pacientes que referem aparecimento de lesões ou até piora de lesões preexistentes.²⁶ Um estudo que explorava a qualidade de vida mostrou agravamento das lesões pelo estresse, relatado por 26,3% das pacientes.⁵ Resultados semelhantes foram identificados em estudo brasileiro que avaliou pacientes através de um escore de traço de ansiedade, e quanto ao uso de medicações psicotrópicas.¹⁶

O componente genético é outro fator envolvido na gênese da doença. Há dados de que a história familiar de melasma seja referida em 56,3% dos pacientes, sendo que 47,6% são de familiares de primeiro grau.⁴ Em estudo do Sul do Brasil, identificaram-se 53,6% dos pacientes com história familiar positiva.⁵

Em estudo com homens latinos, em 2009, formado por grupos de trabalhadores rurais da Carolina do Norte (EUA), sendo a maioria mexicanos e guatemaltecos, a prevalência de melasma foi maior entre os procedentes da Guatemala (50%) do que nos do México (13,5%). Aqueles que falavam algum dialeto indígena apresentaram melasma com maior frequência (21,1%) do que os que falavam apenas espanhol (13,0%), sugerindo que fatores genéticos influenciem na prevalência da doença.²⁷

Apesar da alta frequência de acometimento familiar, o padrão de segregação genética ainda não foi definido.⁶ Há ainda evidências de que a miscigenação europeia com certos grupos étnicos, como indígenas e africanos, possa favorecer o desenvolvimento do melasma, mas a ancestralidade genética desses pacientes também não foi explorada até o momento.¹⁶

O fototipo é outro fator importante que está ligado ao componente genético (genes responsáveis pela pigmentação) herdado por estes indivíduos e também é reativo a fatores ambientais, principalmente a exposição solar. Diversos estudos revelam maior prevalência do melasma em fototipos intermediários de Fitzpatrick de III a V. No Brasil, um estudo no Sudeste, revelou predominância da doença em pacientes de fototipos III (34,4%), IV (38,4%) e V (15,6%). Da mesma forma, em outro estudo, conduzido no Sul, 86,9% dos pacientes pertenciam aos fototipos III e IV.^{4,5}

Do ponto de vista histopatológico, no melasma há aumento da deposição da melanina em toda a epiderme, os melanócitos são maiores com organelas e dendritos proeminentes contendo mais melanossomos (e de maior maturidade) que na pele adjacente não afetada, sugerindo melanócitos hipertróficos e

hiperfuncionantes. Na derme, há discreto aumento de celularidade, especialmente linfócitos e mastócitos, além de elastose solar (figura 3).^{28,29}

O papel dos fibroblastos e vasos sanguíneos no desenvolvimento e manutenção do melasma foi investigado por alguns autores. Aumento da expressão do fator de células tronco (SCF), dos fibroblastos e c-kit foi demonstrado na pele com melasma. Citocinas derivadas dos fibroblastos estimulam a proliferação dos melanócitos e a melanogênese em cultura, como ocorre na hiperpigmentação pós-inflamatória. É possível que a inflamação da derme induzida pela exposição crônica à RUV esteja associada com a ativação de fibroblastos que fazem *upregulation* de SCF, levando ao aumento da melanogênese.³

O melasma foi também caracterizado por componente vascular proeminente tanto clínica quanto histologicamente. O número de vasos teve uma relação positiva com a pigmentação epidérmica na pele lesada, e a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é aumentada nas lesões de melasma. Não está claro se a vasculatura proeminente é um epifenômeno da RUV ou se constitui fator melanogénico primário.^{30,31}

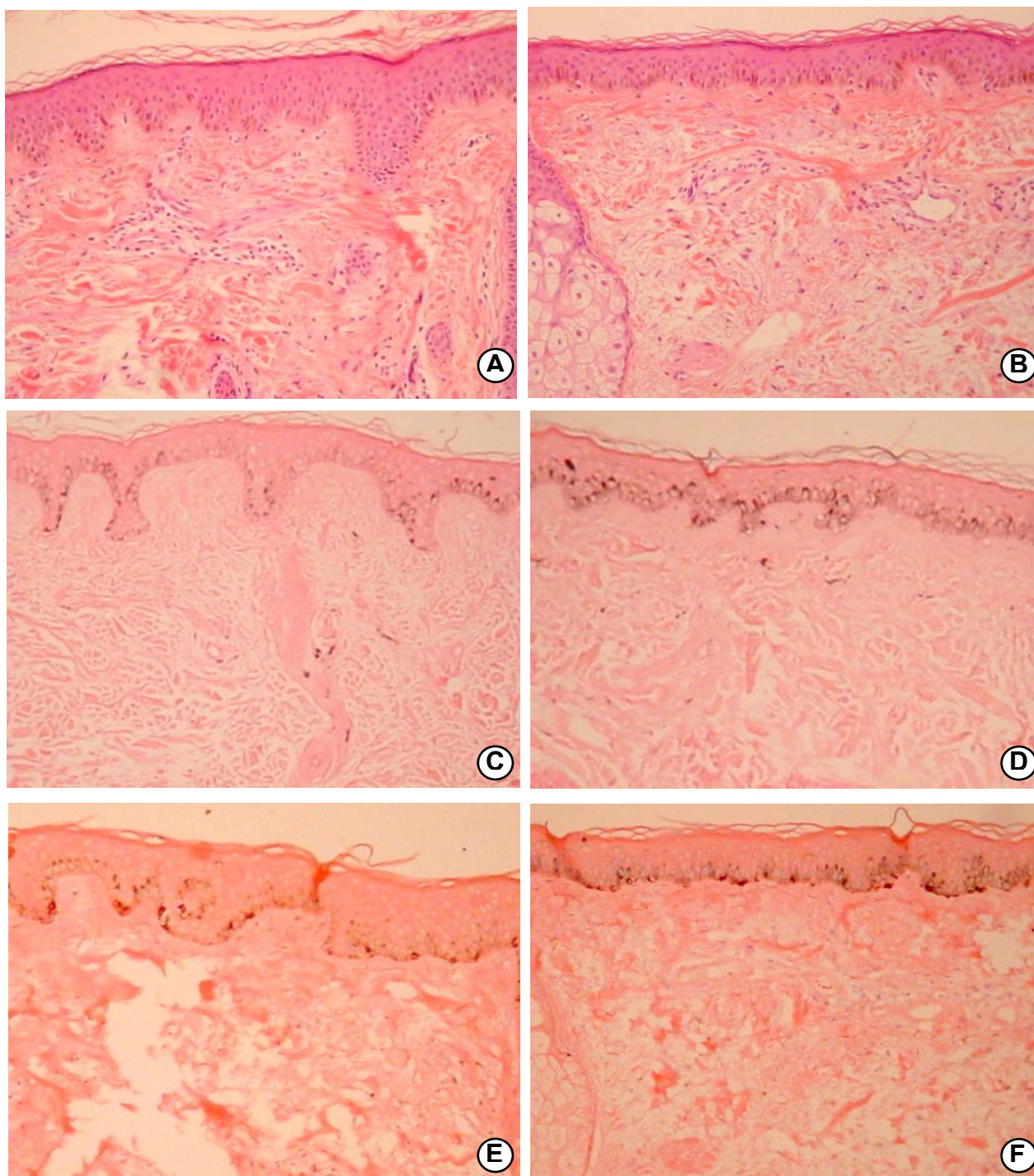


Figura 3. Microscopia de luz representando epitélio com melasma (à direita) e controle (à esquerda). A e B – HE; C e D – Fontana-Masson; E e F – Melan-A.²⁸

De uma forma geral, o melasma pode ser considerado um fenótipo localizadamente mais melanizado, ou com fototipo mais elevado que a pele adjacente.

Existem variações estruturais da pele e da pigmentação melânica em diferentes grupos étnicos-populacionais. Não há diferença quanto à quantidade de melanócitos, mas sim na quantidade e qualidade da melanina epidérmica.

Ocorre uma variação no número, tamanho e agregação de melanossomos nos melanócitos e nos queratinócitos. A pele negroide tem melanossomos grandes, não agregados, com número aumentado na camada basal e distribuídos por todas as camadas da epiderme. Diferente da pele caucasoide, que tem melanossomos pequenos e agregados, alguns nas camadas basal e malpighiana, estando ausentes nas camadas superiores da epiderme.^{3,32} Melanossomos de indivíduos negros africanos são em geral maiores que os melanossomos de indivíduos asiáticos e caucasianos, porém, existem variações mesmo dentro desses grupos populacionais (figura 4).³³

O extrato córneo na pele negra contém mais camadas celulares do que na pele branca, porém, a espessura é igual em ambas, provavelmente por maior coesão intercelular. Há diferenças na vulnerabilidade do extrato córneo associada à dinâmica das ceramidas: o extrato córneo da pele negra possui menos lipídeos, cujos níveis se correlacionam inversamente com a perda transepidérmica de água, maior em negros do que em brancos.^{30,32,34}

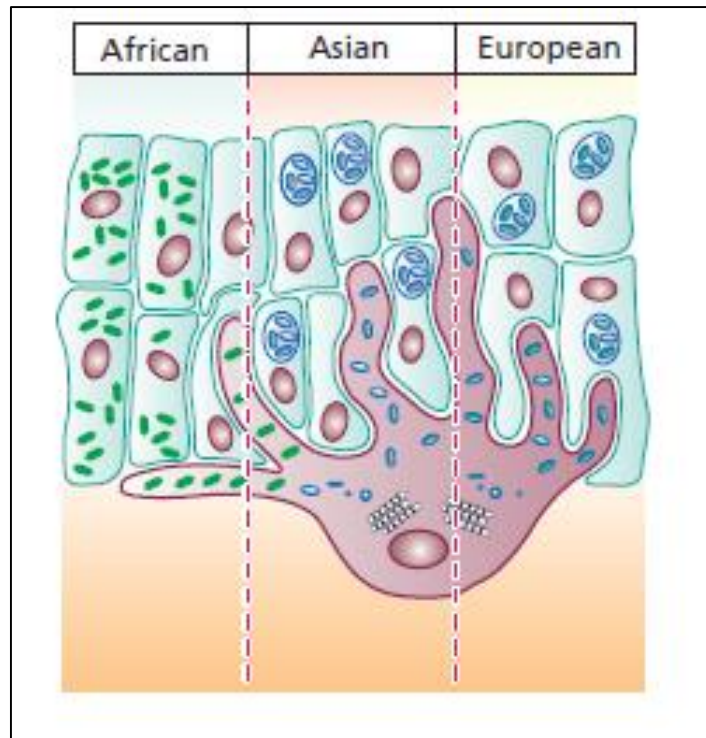


Figura 4. Representação esquemática da melanogênese e da distribuição dos melanossomas em diferentes grupos populacionais.³⁵

Não há diferença na espessura da derme entre negros e brancos, mas parece haver particularidades em alguns aspectos celulares. Os fibroblastos da pele negra são maiores, bi ou multinucleados, em maior número e hiperativos. Os feixes de fibras colágenas são menores e dispostos mais paralelamente à epiderme, além de macrófagos serem maiores e mais numerosos.³²

É interessante notar que características da pele negroide, como os melanossomas grandes e mais maduros, maior celularidade dérmica e a camada lipídica diminuída também estão presentes na pele de pacientes com melasma.^{3,30} A hipótese de um mosaicismismo do sistema pigmentar poderia ser aventada, já que

a miscigenação entre brancos e negros resulta fototipos intermediários que são mais comumente acometidos pelo melasma.

Há diversas vias que controlam a pigmentação (figura 5). A principal, envolve a ativação da unidade epidermo-melânica pela RUV, que aumenta a síntese de hormônio estimulador de melanócito alfa (α -MSH) e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) derivados da proopiomelanocortina (POMC) dos queratinócitos. Esses peptídeos levam à proliferação de melanócitos e aumento da síntese de melanina via estimulação da tirosinase e da proteína relacionada a tirosinase 1 (TRP-1).³⁶ Comparando-se a pele normal da face e o melasma, há maior expressão de α -MSH, MC1-R e tirosinase, na pele lesada.^{28,37}

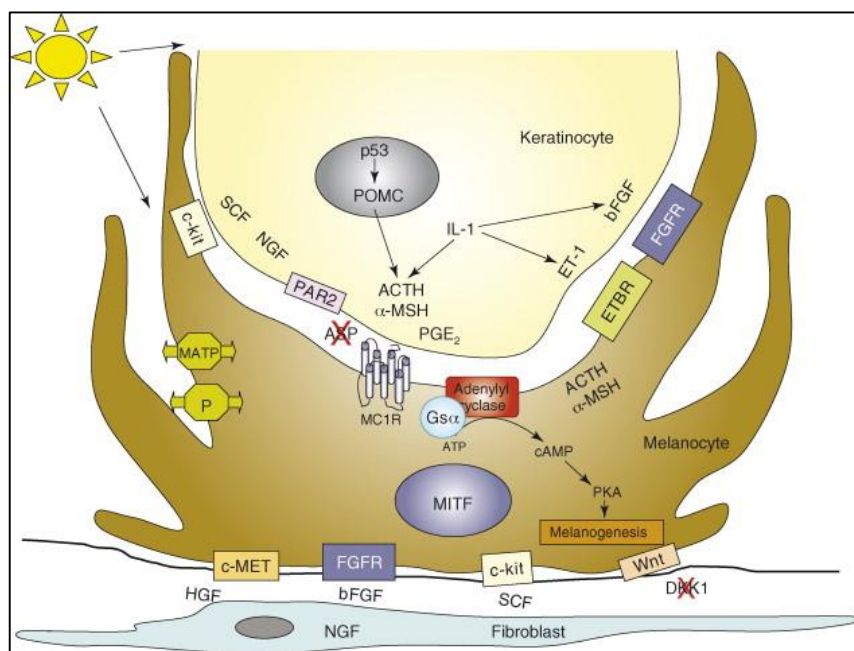


Figura 5. Representação esquemática das vias de pigmentação envolvidas na interação queratinócito, melanócito e fibroblasto.³⁸

Atualmente, mais de 150 genes com efeitos na pigmentação já foram identificados em humanos. Seus produtos exercem influência na produção e regulação da pigmentação. Dentre os mais estudados na determinação da variação normal da pigmentação dos olhos, pele e cabelos estão: MC1-R, ASIP, OCA2, SLC24A5, SLC45A2, TYR e o MITF.^{36,39}

Outros dois genes descritos mais recentemente como alterados na pele com melasma são o WIF-1 e o H19. A expressão do fator inibidor de Wnt tipo 1 (WIF-1) foi detectada na pele sã e afetada de pacientes com melasma. Wnt faz parte da regulação da pigmentação da pele. Estudo recente coreano, bloqueando o WIF-1 de fibroblastos e queratinócitos, evidenciou estímulo na expressão de tirosinase e transferência de melanossomos, enquanto as células com WIF-1 hiperexpresso reduziu estes parâmetros, mostrando a influência deste gene sobre a melanogênese.⁴⁰

O gene H19 pode estar relacionado com o melasma. Em cultura de melanócitos com expressão supressa deste gene, houve uma hiperatividade da tirosinase. Isso sugere que este gene pode estar associado ao desenvolvimento do melasma.⁴¹

Outro estudo coreano, de 2014, utilizando biópsia de melasma e pele adjacente de 5 pacientes, que avaliou 334 genes envolvidos em diferentes vias de pigmentação, demonstrou diferença significativa no grau de expressão quando comparadas as duas biópsias. Apesar da amostragem restrita, sugere que a patogênese do melasma pode se associar ao *up* ou *downregulation* desses genes.⁴² Cabe discutir que os autores avaliaram a expressão gênica de pele total, o que amostra mais representativamente os queratinócitos, do que melanócitos,

endotélio e fibroblastos, células também envolvidas na pigmentação, e que podem responder pelas alterações fisiopatológicas da doença.

Atualmente, não há cura para o melasma, apesar de sua prevalência diminuir com a idade. Existem diversas modalidades de tratamento, porém este ainda é um desafio para os dermatologistas, pois pode desencadear efeitos adversos locais e serem dispendiosos financeiramente. As lesões podem permanecer por muitos anos e as recorrências são comuns, por isso a manutenção do tratamento após melhora inicial é recomendada.⁴³

Enquanto os tratamentos se basearem na inibição da melanogênese e remoção do excesso de melanina epitelial, em detrimento da ação focada na origem da disfunção celular, o melasma deve tender a recidivar, o que justifica a dedicação ao estudo da sua fisiopatologia.

Da mesma forma, a identificação de grupos de risco, incluindo o componente genético, pode contribuir em ações preventivas para esses indivíduos, como medidas de proteção solar e evitação da exposição intensa ou precoce a hormônios esteroides.

Origem do homem atual e os principais grupos populacionais

O homem moderno, *Homo sapiens sapiens*, é uma espécie jovem no planeta e há evidências de sua origem entre 100 e 200 mil anos, na África.⁴⁴ Há dois modelos teóricos elaborados para explicar a origem do *Homo sapiens sapiens*: a monogênese africana (*out of Africa*) e a multirregional.

No *out of Africa*, a distribuição atual da nossa espécie é associada ao êxodo do *Homo sapiens sapiens* da África oriental para outras regiões do mundo, gradualmente substituindo o *Homo erectus* e outras populações arcaicas de hominídeos com as quais se deparavam. A diversidade biológica que hoje encontramos entre as diversas populações humanas seria consequência de divergências posteriores ao êxodo que ocorreu entre populações de diferentes localidades, pelo isolamento geográfico, cruzamentos internos, seleção natural e fenômenos de gargalo (figura 6).^{45,46}

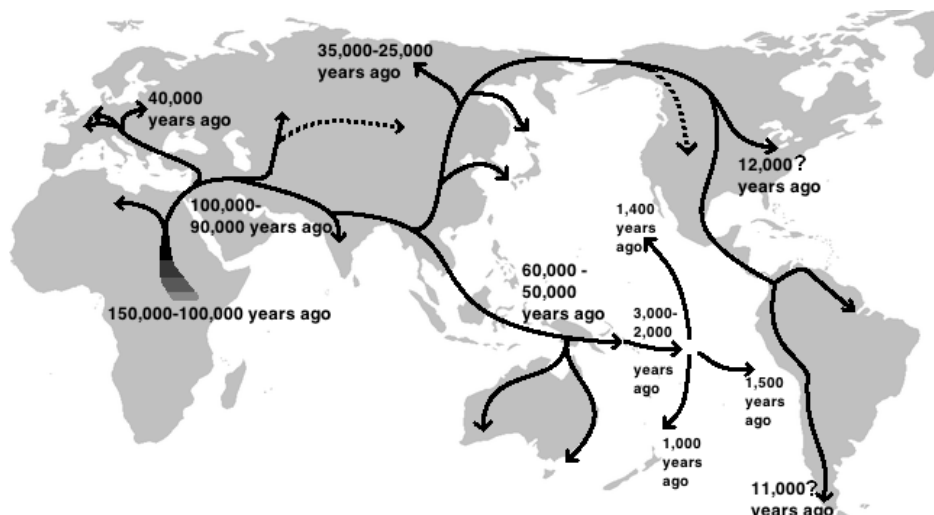


Figura 6. Modelo representativo da hipótese *out of Africa*.⁴⁷

De acordo com o modelo multirregional essa transformação não teria acontecido apenas na África, mas em vários locais do planeta. A data aceita para a existência de um ancestral comum a todos os humanos é diferente segundo este modelo: 800.000 a 1.000.000 de anos atrás, justamente a época em que os *Homo erectus* deixavam a África e colonizavam outras regiões do mundo. A diversidade genética e morfológica atual seria fruto de múltiplos processos de origem do *Homo sapiens sapiens* que ocorreram independentemente. Cada evento de suposta especiação originaria os diferentes grupos populacionais que hoje existem.⁴⁸

Recentemente, foi realizada análise completa do DNA mitocondrial de 53 indivíduos de várias localidades e grupos étnicos, na qual foram avaliadas 16,5 mil pares de bases. A análise mostrou que a árvore genealógica do DNA mitocondrial sugere que nossas raízes estão na África, e que o êxodo do *Homo sapiens sapiens* ocorreu entre 100-150 mil anos atrás, corroborando para a teoria *out of Africa*.⁴⁹ Porém, outros achados paleoantropológicos não descartam totalmente a teoria multirregional.⁵⁰

A hipótese mais aceita é que os *Homo sapiens sapiens* emigraram da África para outros continentes, substituindo em seu trajeto o homem de Neandertal (*Homo neandertales*), o *Homo erectus* e outras populações arcaicas. Logo, todos os seres humanos teriam um ancestral comum africano. Porém, há uma diversidade morfológica humana, de origem bioquímica, molecular e genética, decorrente do processo evolutivo.^{46,50} Dessa forma, os principais grupos populacionais da atualidade teriam sido selecionados como: europeus, africanos, ameríndios e asiáticos. Há vários outros subgrupos destes, porém tal abordagem ultrapassa o escopo desse texto.

A variabilidade genotípica dos grupos populacionais implicou no desenvolvimento de diferentes respostas fisiológicas, originando propensões a doenças, respostas imunológicas e terapêuticas independentes. Esses elementos devem ser considerados em estudos clínicos, especialmente em populações com alta miscigenação, como a brasileira.⁵¹⁻⁵³

Há poucos estudos antropológicos sobre a evolução da pele humana. Devido a inexistência de registros fósseis de pele e partes moles, as hipóteses do processo evolutivo de formação e diferenciação do tegumento se baseiam em teorias migratórias adaptativas, estudos de anatomia comparada e evolução genética molecular.^{54,55}

Os primeiros exemplares da espécie humana haveriam evoluído de um ancestral primata, com pilificação abundante e pele clara, tais quais os grandes macacos modernos.⁵⁶⁻⁵⁸

As razões para a considerável perda dos pelos em todos os subgrupos populacionais humanos, mas não nas demais derivações símias não são claras ainda. Todavia, extensas coberturas de pelos poderiam representar aquecimento excessivo para as atividades caçadoras-coletoras das sociedades primitivas, menor agilidade para deslocamentos aquáticos e serem substrato para a proliferação de parasitas e transmissão de doenças.⁵⁹⁻⁶⁴

A perda de pelos e o processo de migração para a África subsaariana, Europa, Ásia, e, posteriormente, as Américas gerou isolamento geográfico e a maior diferenciação dos principais fenótipos populacionais contemporâneos.^{65,66}

A cor da pele é um dos elementos fenotípicos mais representativos da individualidade de grupos populacionais, infelizmente, também se associa a

segregações sociais até os dias atuais.⁶¹ A hipótese mais aceita para a diferenciação das tonalidades da cor da pele deve-se ao ganho evolutivo decorrente da síntese de vitamina D pelo UVB, e à fotólise do ácido fólico na pele pelo UVA.^{57,67,68} Povos que migraram para latitudes mais altas, com menor incidência de UVB, como áreas subtropicais da Europa, foram selecionados pela alta demanda de vitamina D na gestação, lactação e desenvolvimento infantil. Em paralelo, em regiões muito ensolaradas, manteve-se a melanização da pele para não haver depleção de ácido fólico, essencial para o desenvolvimento do tubo neural, fertilidade e hematopoiese.^{57,69,70}

A maior evidência dessa teoria é a forte correlação entre a pigmentação constitucional, e a distribuição geográfica da latitude e altitude de povos primitivos.⁷¹ As diferentes vias de pigmentação em resposta a estímulos ambientais haveriam se desenvolvido com características diferentes nesses grupos.^{55,67,72,73}

A evolução das espécies não decorre da ação de um único fator, mas da conjunção de pressões ambientais selecionando grupos mais adaptáveis às condições impostas e que possam perpetuar suas características genéticas mais eficientemente. Além da questão da vitamina D e do ácido fólico, adaptações climáticas, geográficas, aspectos de seleção sexual, pedomorfismo e até a incidência de melanoma induzido por RUV em espécimes com menor melanização podem ter contribuído para a diferenciação fenotípica do homem atual.⁷⁴

Ancestralidade da População Brasileira

A população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo, e formou-se como resultado de cinco séculos de cruzamentos interétnicos principalmente entre indivíduos de três continentes: colonizadores europeus, escravos africanos e indígenas (nativos brasileiros), gerando grande riqueza genética e sócio-cultural em nosso território.⁷⁵

Estima-se que, há mais de 500 anos atrás, quando os portugueses chegaram ao Brasil, este era habitado por cerca de 2,5 milhões de indígenas. A miscigenação (europeia x ameríndia) iniciou-se imediatamente após a chegada dos portugueses, quando o relacionamento entre homens europeus e mulheres indígenas era comum e politicamente incentivado.⁷⁵ Apesar disso, a população indígena diminuiu drasticamente por conta dos conflitos com os colonizadores e pelas doenças trazidas por estes.⁷⁶

O censo de 2010 do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) evidencia uma população atual de indígenas de 896,9 mil indivíduos, bem inferior àquela encontrada há 500 anos.⁷⁷

A população africana foi introduzida em meados do século XVI, trazida para o Brasil para trabalhar como mão de obra escrava na cultura de cana de açúcar, depois, na mineração de ouro e pedras preciosas, e, posteriormente, na cultura de café. Até a abolição da escravatura, em 1888 (Lei Áurea), aproximadamente 3,5 milhões de africanos chegaram ao Brasil.⁷⁶

A África Centro-Occidental (atualmente Angola) forneceu a maior parte dos escravos utilizados em toda a América portuguesa. Posteriormente, no século

XVIII, o comércio do Rio de Janeiro, Recife e São Paulo recebeu escravos da costa leste africana, particularmente Moçambique. E, na Bahia, do século XVII até o fim do tráfico em 1850 (Lei Eusébio de Queirós) eram provenientes da Nigéria.^{78,79}

Estima-se que 500 mil europeus de Portugal chegaram ao país entre 1551 e 1808. Após a transferência da corte portuguesa para o Brasil (1808), houve a abertura dos portos para comércio com as nações amigas, resultando na vinda de milhares de imigrantes de todo o mundo. Mais recentemente, no final do século XIX houve intensa imigração de outros europeus, principalmente italianos, espanhóis e alemães, para o trabalho agrícola e industrial. Durante o século XX, houve imigração da Ásia, principalmente japoneses, coreanos, libaneses e sírios. Estima-se que entre 1500 e 1972, 58% dos imigrantes que chegaram ao Brasil eram europeus, 40% africanos, e 2% asiáticos.⁷⁵

Em estudo genético para mapear a população autodeclarada branca no Brasil, foram utilizados marcadores uniparentais do cromossomo Y (origem paterna) e do DNA mitocondrial (origem materna) que constatou ser a maioria da linhagem paterna de origem europeia, enquanto o DNA mitocondrial (materno) dividiu-se 33% indígena, 39% europeu e 28% africano. A maioria da linhagem mitocondrial indígena foi encontrada na população do Norte do País; a africana, no Nordeste; e a europeia, no Sul. O Sudeste apresentou equilíbrio nas frequências de ancestralidade materna. Estes resultados reproduzem a história da colonização e formação étnica do País.⁷⁵

Descendentes de africanos têm tipicamente pele negra e outras características físicas como lábios grossos, nariz largo, cabelos encaracolados e

olhos escuros. Descendentes de europeus exibem pele clara, cabelos lisos, olhos claros, nariz e lábios finos. Essas características são geneticamente determinadas por um número relativamente pequeno de genes que, durante a evolução, foram selecionados pelo meio ambiente (localização geográfica), especialmente pelos níveis de exposição à RUV a que estes indivíduos foram submetidos.⁶⁵

Em uma população formada por extensa mistura de europeus, indígenas e africanos, como acontece no Brasil, a associação entre ancestralidade e a cor da pele dissipa-se com o tempo. A alta taxa de miscigenação torna as características fenotípicas pobres indicadores geográficos da origem ancestral destes indivíduos.⁷⁵

Em muitos países, a cor da pele é tradicionalmente usada em estudos clínicos e farmacológicos como referência do fenótipo à ancestralidade geográfica. No Brasil, isso também ocorre, entretanto, devido à intensa miscigenação, a cor da pele pode ser imprecisa para identificar a ancestralidade genética do indivíduo.⁶⁵

O IBGE classifica, de acordo com a autodeclaração, o indivíduo em “branco”, “pardo” e “preto”, como categorias estruturais para pesquisas populacionais. Embora esses termos refiram-se a um complexo de pigmentação da pele, cor e textura do cabelo, cor dos olhos, forma do nariz e espessura dos lábios, que conjuntamente compõem o caráter “cor” da população brasileira, não podem ser utilizados como marcadores fiéis de ancestralidade genética.⁷⁵ Indivíduos autodeclarados brancos ou pretos, dependendo da região geográfica em que residem, podem possuir altos graus de participação de ancestralidade

genética europeia, indígena e africana independente da cor que exibem na pele (fenótipo).

Além disso, discute-se ainda que o termo “raça” não seria mais interessante para esta classificação de populações fenotipicamente distintas. Do ponto de vista biológico, não existem raças humanas, existe apenas o *Homo sapiens sapiens*. O termo raça é uma construção social associado à etnia, diferindo-se, entretanto, pelo fato de um grupo étnico ser uma comunidade humana definida por afinidades linguísticas e culturais, e semelhanças genéticas.³²

A relação entre etnia autodeclarada, ancestralidade genética e DNA mitocondrial de 492 indivíduos do Sudeste brasileiro, mostrou que não é confiável relacionar a cor da pele declarada pelo indivíduo, com os achados de herança genética.⁵³ Dessa forma, do ponto de vista da composição gênica da população brasileira, a classificação de “raça” não tem um papel útil na avaliação clínica do paciente individual, e a medicina só tem a ganhar ao se banir tal termo de sua prática.⁸⁰

Frente a essa discussão levanta-se uma importante questão que torna inaceitável o discurso diário de políticas de cotas ou benefício a descendentes negros ou índios. Da mesma forma, no que diz respeito à literatura médica e científica, sobre doenças prevalentes em caucasoides ou negroides, em uma população altamente miscigenada.⁶⁵

A categorização fenotípica cutânea frequentemente utilizada em estudos clínicos é a classificação de fototipos segundo Fitzpatrick em I a VI (quadro 1),

que se divide, de acordo com aspectos de cor da pele, cabelos, olhos e a resposta (quanto à pigmentação e queimadura) à exposição solar.²

Quadro 1. Classificação (adaptada) dos fototipos de Fitzpatrick.²

Fototipos	Características clínicas	Sensibilidade ao sol
I – Branco (celta)	Queima com facilidade, nunca bronzeia, sardas, olhos claros e cabelos claros.	Muito sensível
II – Branco	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco.	Sensível
III – Claro (caucasoide)	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente, cabelos castanhos	Normal
IV – Moreno	Queima pouco, bronzeia com facilidade, cabelos castanhos escuros.	Normal
V – Moreno escuro (pardo)	Queima raramente, bronzeia bastante, cabelos e olhos escuros.	Pouco sensível
VI – Muito escuro (negro)	Nunca queima, totalmente pigmentada, cabelos e olhos escuros.	Insensível

Esta classificação aparentemente tem fácil aplicabilidade, sendo mais confiável que a do IBGE, porém, como depende da autodeclaração quanto à queimadura e bronzeamento da pele, às vezes pode gerar dificuldade de discernimento, já que muitas pessoas não conseguem definir claramente esses aspectos.⁸¹

A pigmentação cutânea segue herança poligênica, e indivíduos com fototipos intermediários (III a V) apresentam maior incidência de melasma.¹⁵ A progressiva miscigenação da população mundial favorece a composição de fenótipos intermediários, já que os extremos europeus e africanos permutam genes que resultam em heranças de pigmentação variadas. Como melasma representa padrões localizados de pigmentação em resposta à RUV, uma

hipótese que pode ser aventada é que decorra do efeito de mosaicismo ligado a vias de pigmentação da pele, em indivíduos miscigenados.

Em estudo com células tronco pluripotentes derivadas de fibroblastos da pele, houve variação entre as células-cópias, demonstrando a existência de mosaicismo entre elas, o que significa que a pele pode apresentar um mosaico genético, com possível comportamento individualizado de seus clones.⁸²

Como ocorre importante miscigenação, a ancestralidade referida da população brasileira é de baixa confiabilidade, pois, dificilmente a memória remonta mais de três gerações. Em estudo caso-controle a ascendência indígena foi referida em 42% das mulheres com melasma facial e 19% de controles da mesma faixa etária.¹⁶

Os grandes grupos populacionais do planeta variam consideravelmente quanto à predisposição às doenças e na frequência de alelos importantes que impactam na sensibilidade a agravos em saúde e mesmo quanto à resposta terapêutica a fármacos. Essas variações derivam principalmente da evolução genética, mas também da adaptação aos fatores locais de seleção como o clima e nutrientes disponíveis.⁶⁵

Por essa razão, a investigação de doenças em uma população deve considerar simultaneamente elementos genéticos e de pressão ambiental para seu desenvolvimento. Há estudos recentes que tentam elucidar não só os mecanismos de pigmentação da pele, mas também a variabilidade dessa pigmentação em grupos étnicos diferentes e relacionando com sua ancestralidade.⁷³

Avaliação da ancestralidade genética

Uma das formas mais utilizadas para avaliar a composição ancestral de uma população é o uso de marcadores genéticos informativos de ancestralidade (AIM – *Ancestry Informative Marker*).

AIM é um marcador genético autossômico que apresenta diferença de frequência alélica (>40%) entre duas ou mais populações, e pode se constituir de qualquer tipo de marcador genético, como por exemplo o polimorfismo de base única (SNP – *single nucleotide polymorphism*) ou polimorfismo de inserção/deleção (INDEL).⁵³

Várias técnicas de investigação podem ser utilizadas para a análise genética de populações. O uso de INDEL tornou-se frequente, pois é fonte abundante de marcadores genéticos, vastamente encontrado ao longo do genoma. Os seres humanos possuem aproximadamente 1,5 milhões de INDELs.

A frequência alélica de vários INDELs é diferente em populações distintas, o que permite que seja usado como AIM. Além disso, os INDELs são genotipados de forma simples com base na separação por tamanho (número de pares de base). Raramente, duas mutações de tamanhos iguais são encontradas na mesma posição do genoma. Outra vantagem, é que a identificação dos INDELs é rápida e de custo relativamente acessível para genotipagem.⁸³⁻⁸⁵

A genotipagem desses INDELs é realizada por meio de sequenciamento de DNA no qual é identificada a ordem dos nucleotídeos presentes na amostra gerando uma sequência de pares de base que será posteriormente caracterizada

como uma inserção ou deleção através de consulta em banco de dados que contém informações sobre a sequência e sua prevalência em populações.

Estudos comparando a ancestralidade de pacientes são utilizados amplamente visando entender a etiologia genética e ambiental de muitas doenças em populações humanas. Em estudo recente brasileiro, a avaliação de INDELs e SNPs associou-se à resposta do paciente com hanseníase à poliquimioterapia para controle da doença, demonstrando que diferenças genéticas pontuais modificam o desfecho terapêutico do hospedeiro.⁵²

Outro estudo brasileiro utilizando 12 AIMs para avaliar a ancestralidade europeia, africana e indígena em pacientes com neuromielite óptica e esclerose múltipla revelou maior componente ancestral europeu nos dois grupos, enquanto o componente africano foi o menos frequente.⁸⁶

Há diversos estudos que investigam características da pigmentação da pele entre diferentes populações. Foi identificado um vasto número de genes envolvidos na pigmentação. Dentre os principais estão: TYR, TYRP1, OCA2, SLC45A2, SLC24A5, MC1R, ASIP, KITLG, SLC24A4, IRF4, TPCN2, OPMR1 e EGFR. Sendo que, para cada população (asiática, europeia, ameríndia e africana), foram encontradas diferentes polimorfismos e padrões de expressão em genes de pigmentação da pele, permitindo a investigação da ancestralidade ligada à melanogênese.^{39,73,87}

Em estudo pioneiro, Quillen e colaboradores pesquisaram a pigmentação da pele em ameríndios. Avaliando duas populações indígenas americanas reconheceram, em indígenas, atividade de dois genes cujo papel ainda não tinha sido identificado na pigmentação da pele: EGFR e o OPRM-1. O EGFR induz fosforilação da tirosina que tem papel na proliferação, diferenciação, migração e

morte dos queratinócitos, sendo que este regula a proliferação e diferenciação do queratinócito. O OPRM-1 codifica um receptor de opioide, sendo, portanto um candidato incomum para influência na pigmentação da pele, apesar desses receptores estarem ativos em queratinócitos e melanócitos e poder ter influência sobre essas células. Essa regulação neural sugere a associação da origem da pele com sistema nervoso.⁷³

Até o momento, não há estudos que explorem a ancestralidade populacional e o melasma, e que possam sugerir genes candidatos ao estudo da fisiopatologia da doença, de acordo com particularidades de pigmentação de cada ancestralidade.⁸⁸

Desde que a pele apresente um componente pigmentar em mosaico, alterações fenotípicas e de expressão de receptores sejam diferentes nas peles com melasma e são, sabendo-se que diferentes indivíduos ativam diferentes vias de pigmentação e considerando a miscigenação da população brasileira. Justifica-se a hipótese de que melasma possa representar um mosaicismo do sistema pigmentar, decorrente da miscigenação da população e induzido por estímulos ambientais, como a RUV, medicamentos e esteroides sexuais.

Além disso, a tendência à miscigenação da população brasileira pode indicar um aumento futuro na prevalência da doença, o que justifica estudos visando a caracterização de populações de risco e intervenções preventivas.

Referências

1. Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a comprehensive update: part I. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:689-97.
2. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988;124:869-71.
3. Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. [Physiopathology of melasma]. *An Bras Dermatol* 2009;84:623-35.
4. Tamega A de 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;27:151-6.
5. 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;22:655-62.
6. Handel AC, Miot LD, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol* 2014;89:771-82.
7. Blanc AK, Tsui AO, Croft TN, Trevitt JL. Patterns and trends in adolescents' contraceptive use and discontinuation in developing countries and comparisons with adult women. *Int Perspect Sex Reprod Health* 2009;35:63-71.
8. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol* 2006;81:549-58.
9. 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;89:529-31.
10. Sivayathorn A. Melasma in orientals. *Clin Drug Invest* 1995;10:34-40.
11. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol* 2013.
12. Achar A, Rathi SK. Melasma: a clinico-epidemiological study of 312 cases. *Indian J Dermatol* 2011;56:380-2.
13. Goh CL, Dlova CN. A retrospective study on the clinical presentation and treatment outcome of melasma in a tertiary dermatological referral centre in Singapore. *Singapore Med J* 1999;40:455-8.
14. Sarkar R, Jain RK, Puri P. Melasma in Indian males. *Dermatol Surg* 2003;29:204.
15. 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;27:151-6.
16. 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;171:588-94.
17. Young Kang H, Ortonne JP. Melasma update. *Actas Dermosifiliogr* 2009;100 Suppl 2:110-3.
18. Tamega A de A, Miot HA, Silva MG, Marques MEA, Miot LDB. Gene and protein expression of estrogen β and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women. *Int J Cosmet Sci* 2014;(ahead of print).
19. Locci-Molina N, Wang A, Kroumpouzou G. Melasma Improving Spontaneously upon Switching from a Combined Oral Contraceptive to a Hormone-Releasing Intrauterine Device: A Report of Four Cases. *Acta Derm Venereol* 2014.
20. Resnik S. Melasma induced by oral contraceptive drugs. *JAMA* 1967;199:601-5.
21. Hexsel D, Rodrigues TC, Dal'Forno T, Zechmeister-Prado D, Lima MM. Melasma and pregnancy in southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23:367-8.
22. Moin A, Jabery Z, Fallah N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy. *Int J Dermatol* 2006;45:285-8.
23. 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;27:1088-94.
24. Duarte I, Campos Lage AC. Frequency of dermatoses associated with cosmetics. *Contact Dermatitis* 2007;56:211-3.

25. Prabha N, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Gupta M. Cosmetic contact sensitivity in patients with melasma: results of a pilot study. *Dermatol Res Pract* 2014;2014:316219.
26. Wolf R, Wolf D, Tamir A, Politi Y. Melasma: a mask of stress. *Br J Dermatol* 1991;125:192-3.
27. Pichardo R, Vallejos Q, Feldman SR, et al. The prevalence of melasma and its association with quality of life in adult male Latino migrant workers. *Int J Dermatol* 2009;48:22-6.
28. 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;32:676-82.
29. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002;146:228-37.
30. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:1533-7.
31. Kim EH, Kim YC, Lee ES, Kang HY. The vascular characteristics of melasma. *J Dermatol Sci* 2007;46:111-6.
32. Alchorne MMA, Abreu MAMM. Dermatologia na pele negra. *An Bras Dermatol* 2008;83:7-20.
33. Sturm RA, Box NF, Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* 1998;20:712-21.
34. Muizzuddin N, Hellemans L, Van Overloop L, Corstjens H, Declercq L, Maes D. Structural and functional differences in barrier properties of African American, Caucasian and East Asian skin. *J Dermatol Sci* 2010;59:123-8.
35. McGrath JA, Uitto J. Anatomy and Organization of Human Skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, eds. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8 th ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell; 2010:3.25.
36. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013;88:76-83.
37. Tully G. Genotype versus phenotype: human pigmentation. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1:105-10.
38. Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech* 2008;5:e189-e99.
39. Lao O, de Gruijter JM, van Duijn K, Navarro A, Kayser M. Signatures of positive selection in genes associated with human skin pigmentation as revealed from analyses of single nucleotide polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2007;71:354-69.
40. Kim JY, Lee TR, Lee AY. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J Invest Dermatol* 2013;133:191-200.
41. Kim NH, Lee CH, Lee AY. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:84-92.
42. Chung BY, Noh TK, Yang SH, et al. Gene Expression Profiling in Melasma in Korean Women. *Dermatology* 2014;333-42.
43. Grimes PE, Bhawan J, Guevara IL, et al. Continuous therapy followed by a maintenance therapy regimen with a triple combination cream for melasma. *J Am Acad Dermatol* 2010;62:962-7.
44. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:870-6.
45. Tattersall I. Out of Africa: modern human origins special feature: human origins: out of Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16018-21.
46. Meyer D. As origens do homo sapiens sapiens: uma questão ainda não esclarecida. *Cadernos de Campo* 1992;2:124-31.
47. Human migration out of Africa. 2014. (Accessed 2014, at http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_migration_out_of_Africa.png.)
48. Meyer D. As origens do homo sapiens sapiens: uma questão ainda não esclarecida. *Cadernos de Campo* (São Paulo, 1991) 1993.
49. Hedges SB. Human evolution. A start for population genomics. *Nature* 2000;408:652-3.
50. Farah LC. *Acaso humano: História dos caminhos e descaminhos da evolução*. 1 ed. Teixeira de Freitas: New Impress; 2012.
51. Flores C, Ma SF, Pino-Yanes M, et al. African ancestry is associated with asthma risk in African Americans. *PLoS ONE* 2012;7:e26807.
52. Pinto P, Salgado CG, Santos N, et al. Polymorphisms in the CYP2E1 and GSTM1 genes as possible protection factors for leprosy patients. *PLoS ONE* 2012;7:e47498.

53. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS ONE* 2013;8:e62005.
54. Lowenstein EJ. Paleodermatology update. *Dermatol Nurs* 2006;18:245-6.
55. Hudjashov G, Villems R, Kivisild T. Global patterns of diversity and selection in human tyrosinase gene. *PLoS ONE* 2013;8:e74307.
56. Lalueza-Fox C, Rompler H, Caramelli D, et al. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science* 2007;318:1453-5.
57. Jablonski NG, Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol* 2000;39:57-106.
58. Mundy NI, Kelly J. Investigation of the role of the agouti signaling protein gene (ASIP) in coat color evolution in primates. *Mamm Genome* 2006;17:1205-13.
59. Sandel AA. Brief communication: Hair density and body mass in mammals and the evolution of human hairlessness. *Am J Phys Anthropol* 2013;152:145-50.
60. Schwartz GG, Rosenblum LA. Allometry of primate hair density and the evolution of human hairlessness. *Am J Phys Anthropol* 1981;55:9-12.
61. Jablonski NG. The evolution of human skin colouration and its relevance to health in the modern world. *J R Coll Physicians Edinb* 2012;42:58-63.
62. Pagel M, Bodmer W. A naked ape would have fewer parasites. *Proc Biol Sci* 2003;270 Suppl 1:S117-9.
63. Rantala MJ. Human nakedness: adaptation against ectoparasites? *Int J Parasitol* 1999;29:1987-9.
64. Newman RW. Why man is such a sweaty and thirsty naked animal: a speculative review. *Hum Biol* 1970;42:12-27.
65. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE* 2011;6:e17063.
66. Maddox J. Migration out of Africa. *Nature* 1994;372:32.
67. Rees JL, Harding RM. Understanding the evolution of human pigmentation: recent contributions from population genetics. *J Invest Dermatol* 2012;132:846-53.
68. Yuen AW, Jablonski NG. Vitamin D: in the evolution of human skin colour. *Med Hypotheses* 2010;74:39-44.
69. Lucock M, Yates Z, Martin C, et al. Vitamin D, folate, and potential early lifecycle environmental origin of significant adult phenotypes. *Evol Med Public Health* 2014;2014:69-91.
70. Jablonski NG, Chaplin G. Epidermal pigmentation in the human lineage is an adaptation to ultraviolet radiation. *J Hum Evol* 2013;65:671-5.
71. Chaplin G. Geographic distribution of environmental factors influencing human skin coloration. *Am J Phys Anthropol* 2004;125:292-302.
72. McEvoy B, Beleza S, Shriver MD. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 2:R176-81.
73. Quillen EE, Bauchet M, Bigham AW, et al. OPRM1 and EGFR contribute to skin pigmentation differences between Indigenous Americans and Europeans. *Hum Genet* 2012;131:1073-80.
74. Jablonski NG, Chaplin G. Colloquium paper: human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107 Suppl 2:8962-8.
75. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000;67:444-61.
76. Ribeiro D. O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. In. 2nd ed. São Paulo: Companhia das Letras; 1995.
77. Os indígenas no Censo Demográfico 2010. IBGE, 2012. (Accessed 01/12/2014, 2014, at www.ibge.gov.br/indigenas/indigena_censo2010.pdf.)
78. Zamparoni V. Da escravatura ao trabalho forçado: teorias e práticas. *Africana Studia* 2004;7:299-325.
79. Reis J. Brasil: 500 anos de povoamento. IBGE, IBGE, Rio de Janeiro 2000:80-99.
80. Pena SD. Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 2005;12:321-46.
81. Rampen FH, Fleuren BA, de Boo TM, Lemmens WA. Unreliability of self-reported burning tendency and tanning ability. *Arch Dermatol* 1988;124:885-8.

82. Abyzov A, Mariani J, Palejev D, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012;492:438-42.
83. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010;31:184-90.
84. Pereira R, Phillips C, Pinto N, et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS ONE* 2012;7:e29684.
85. Vali U, Brandstrom M, Johansson M, Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genet* 2008;9:8.
86. Brum DG, Luizon MR, Santos AC, et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. *PLoS ONE* 2013;8:e58925.
87. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 2009;18:R9-17.
88. Zembrzuski VM. Aplicação do índice de ancestralidade africana para o controle de estratificação populacional em estudos de associação. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar a associação entre ancestralidade genética e melasma facial em mulheres.

Objetivos específicos

1. Descrever características clínicas e demográficas de pacientes do sexo feminino portadoras de melasma facial.
2. Comparar a ancestralidade genética de pacientes do sexo feminino portadoras de melasma facial com controles do mesmo gênero e faixa etária, oriundas da mesma região.
3. Comparar elementos clínicos, constitucionais, herança familiar e de exposição em pacientes femininas portadoras de melasma facial com a ancestralidade genética.

3. ARTIGO

Artigo de investigação em português segundo as normas do *British Journal of Dermatology*

Título: Ancestralidade genética africana está associada ao risco de melasma facial em mulheres.

Title: *African genetic ancestry is associated with risk for facial melasma in women.*

Título breve: Ancestralidade genética de mulheres com melasma facial.

Short title: *Genetic ancestry of women with facial melasma.*

Autores:

Maria Paula Barbieri D'Elia

Médica Dermatologista, Mestranda em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Marcela Calixto Brandão

Médica, Residente em Dermatologia na Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Biomédica, Doutoranda na Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP,
Botucatu – SP, Brasil

Márcia Guimarães da Silva

Bióloga, PhD, Professora assistente doutora do Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Luciane Donida Bartoli Miot

Médica Dermatologista, PhD, Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp,
Botucatu-SP, Brasil.

Sidney Emanuel Batista dos Santos

Biólogo, PhD, Professor Associado do Departamento de Patologia da
Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém-PA, Brasil.

Hélio Amante Miot

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

Local de desenvolvimento do trabalho:

Departamentos de Dermatologia e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil e Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA.

Conflito interesse: Nenhum

Financiamento: FUNADERSP: nº. 09/2013.

Resumo

Fundamentos: Melasma é uma hipermelanose focal e adquirida de curso crônico que afeta áreas fotoexpostas, especialmente, de mulheres na menacme. Diversos fatores contribuem para seu desenvolvimento: exposição solar, esteroides sexuais, medicamentos e história familiar. Vias de pigmentação melânica revelaram diversos SNPs em genes responsáveis pela melanogênese em diferentes populações.

Objetivo: Avaliar a associação entre a ancestralidade genética e o melasma facial.

Métodos: Estudo transversal envolvendo mulheres portadoras de melasma e grupo controle, pareado por idade, entre pacientes ambulatoriais da FMB-Unesp, Botucatu (Brasil). Excluíram-se descendentes de asiáticos, portadores de outras dermatoses faciais e fototipos extremos (I e VI). Foi extraído DNA a partir de *swab* da mucosa oral e realizada avaliação da ancestralidade por estudo de INDELS.

Resultados: Avaliaram-se 119 mulheres com melasma facial e 119 controles. A idade média do início do quadro ocorreu aos 27 ± 8 anos. Gestação (40%), exposição solar (37%) e contraceptivo oral hormonal (22%) foram os fatores mais frequentemente relatados como desencadeantes de melasma. Todos os sujeitos apresentaram miscigenação quanto à ancestralidade genética. Os componentes genéticos africano e europeu diferiram significativamente entre casos e controles (10% vs 6%; 77% vs 82%; $p < 0,05$). O percentual de ancestralidade africana (OR=1,04), história familiar de primeiro grau (OR=3,04), baixa escolaridade (OR=4,04) e uso de antidepressivos entre indivíduos com familiares acometidos (OR=6,15) associaram-se ao melasma, independentemente dos demais fatores de risco conhecidos.

Conclusões: Houve associação entre o componente ancestral genético africano e melasma facial em mulheres.

Palavras-chave: Anticoncepcionais, Estudos Transversais, Gravidez, Grupo com Ancestrais do Continente Africano, Grupo com Ancestrais do Continente Europeu, Grupo com Ancestrais Nativos do Continente Americano, Linhagem, Melasma, Mutação INDEL, Pigmentação da pele, Transtornos de pigmentação.

Abstract

Background: *Melasma is an acquired focal hypermelanosis with chronic course that especially affects women in the reproductive age at sun-exposed areas. Several factors contribute to its appearance: sun exposure, sexual steroids, medications, and family history. Melanin pigmentation pathways revealed several SNPs in genes responsible for melanogenesis in different populations.*

Objective: *To evaluate the association between genetic ancestry and facial melasma.*

Methods: *Cross-sectional study involving women with melasma and control group, matched by age, among outpatients of FMB-UNESP, Botucatu (Brazil). Asian descent, subjects with other facial skin diseases and extreme skin phototypes (I and VI) were excluded. DNA from the oral mucosa was extracted by swab and the assessment of ancestry was performed by INDEL study.*

Results: *A total of 119 women with facial melasma and 119 controls were evaluated. The mean age of disease onset was 27 ± 8 years. Pregnancy (40%), sun exposure (37%) and hormonal oral contraceptive (22%) were the most frequently reported factors leading to melasma. All subjects had genetic ancestry admixture. The african and european genetic components differed significantly between cases and controls (10% vs 6%; 77% vs 82%; $p < 0.05$). Percentual of African ancestry (OR = 1.04), first degree family history (OR = 3.04), lower education (OR = 4.04) and use of antidepressive drugs among those with familiar history of melasma (OR = 6.15) were associated with the melasma regardless other known risk factors.*

Conclusions: *There was an association between the African ancestral genetic component and facial melasma in women.*

Keywords: *African Continental Ancestry Group, American Native Continental Ancestry Group, Contraceptive agents, Cross-sectional studies, European Continental Ancestry Group, INDEL Mutation, Melasma, Pedigree, Pigmentation Disorders, Pregnancy, Skin Pigmentation.*

Introdução

Melasma é uma hipermelanose crônica e adquirida que afeta principalmente mulheres, durante a menacme. É caracterizado por máculas assintomáticas acastanhadas e simétricas de bordas irregulares, de contornos nítidos nas áreas fotoexpostas, especialmente, a face.^{1,2}

Por acometer áreas visíveis de pacientes jovens, e, apesar do tratamento, apresentar recorrências frequentes, melasma causa grande impacto emocional e psicológico, afetando diretamente a qualidade de vida.³

A etiologia do melasma ainda não foi esclarecida, porém múltiplos fatores foram descritos como desencadeantes ou agravantes da doença, como: exposição solar, contraceptivos hormonais orais (CHO), terapia de reposição hormonal, cosméticos, medicamentos fotossensibilizantes, gestação e estresse psicológico. Destaca-se ainda grande acometimento familiar (40-60% dos casos), evidenciando o componente genético da doença.^{1,2}

Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) são utilizados para delinear a história genética das diferentes populações, revelando o grau de miscigenação e o componente ancestral dos indivíduos, por apresentarem diferenças de frequência alélica entre as populações definidas geográfica ou etnicamente.⁴

Até o momento, não foram utilizados AIMs para estimar a contribuição genética de cada população ancestral no melasma, tampouco foi explorado o padrão de segregação familiar da doença. Porém, identificou-se que a ancestralidade ameríndia referida estava associada ao desenvolvimento do

melasma, no Brasil.⁵ Além disso, foram identificados polimorfismos e diferentes padrões de expressão em genes relacionados à pigmentação cutânea que se associaram à origem populacional.⁶⁻⁸

Neste estudo, avaliou-se a ancestralidade genética das pacientes quanto aos componentes europeu, africano e ameríndio. A escolha destas três populações se deu pela formação da população atual brasileira que é fruto da miscigenação de mais de 500 anos principalmente entre colonizadores europeus, escravos africanos e nativos.^{9,10}

Casuística e Métodos

Foi conduzido um estudo transversal envolvendo mulheres, maiores de 18 anos, atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, entre os meses de novembro de 2013 a maio de 2014. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CAAE: 19900013.4.0000.5411). (Anexo 1)

As pacientes foram divididas em dois grupos, os casos foram determinados pela presença de melasma facial, e controles, definidos pela ausência de melasma, foram pareados para cada caso (1:1), de acordo com faixa etária (± 5 anos). Todos os diagnósticos foram comprovados por dermatologista titulado.

Excluíram-se do estudo pacientes portadoras de outras dermatoses faciais, que referiram ascendência asiática, e os fototipos extremos I e VI.

A amostragem foi realizada por conveniência, em pacientes atendidos na instituição. Após aceitação e preenchimento do termo de consentimento livre e

esclarecido (Anexo 2), os sujeitos foram entrevistados pela pesquisadora utilizando formulário semiestruturado (Apêndice 1) com informações clínico-epidemiológicas e, após bochecho com água mineral, coletado *swab* (figura 1) da mucosa oral (Catch-All™ Sample Collection Swab Hard Pack da Epicentre).



Figura 1. *Swab* de mucosa oral. Coleta de células para extração do DNA.

O DNA foi extraído utilizando kit QIAmp micro DNA em QIAcube e protocolo QIAmp® *DNA Investigator kit* fornecido pela QIAGEN,¹¹ no Laboratório Materno Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria e armazenado (freezer -80°C) na concentração de até 15ng/ml.

No Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará (LGHM-UFGPA), as amostras foram amplificadas e genotipadas para 62 AIMS de inserção-deleção (INDEL), validados para a população brasileira (Anexo 3).^{12,13}

A amplificação foi realizada a partir da técnica de PCR multiplex, realizada com um volume final de 10µL (1µL de DNA + 1µL de mix de Primers + 5µL Taq PCR Master Mix Qiagen + 1µL Qsolution + 2 µL de água), as condições do termociclador: 15 minutos a 95°C, seguido de dez ciclos (30 segundos a 94°C, 90 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C), após, mais 20 ciclos (30 segundos a 94°C, 90 segundos a 58°C e 60 segundos a 72°C) e o último estágio de 60 minutos a 72°C e 5 minutos a 10°C.¹³

O produto do PCR (1 µL) foi adicionado a um mix contendo 8,7µL de formamida e 0,3µL Gene Scan 500 LIZ *ladder* tamanho padrão (AppliedBiosystems). Os fragmentos de DNA foram genotipados por eletroforese capilar usando sequenciador automático ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e analisados com o programa Gene Mapper® IDv3.2 (Applied Biosystems). A identificação dos alelos foi realizada com referência na escada (ladder LIZ-500, Applied Biosystems) de tamanho padrão conhecido, que foi incluída para controle, assegurando a qualidade das análises.¹³

A estimativa da ancestralidade parental das amostras foi realizada utilizando o software STRUCTURE v2.3.4, considerando três populações parentais (ameríndia amazônica, africana subsaariana, europeia do Oeste), com desempenho classificatório de mais de 98% para cada ancestralidade, baseado em banco de dados do LGHM-UFPA com 593 indivíduos de ancestralidade conhecida.^{13,14}

Análise estatística

Dados categóricos foram representados pelas suas proporções percentuais e comparados entre os grupos pelo teste do qui-quadrado ou qui-quadrado de tendência. Variáveis representadas por dados contínuos foram representadas por suas médias e desvios padrão ou medianas e quartis (p25-p75), se a normalidade não fosse evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk. E foram comparadas pelo teste t de Student ou Mann-Whitney.¹⁵

A análise da diferença proporcional entre o número de topografias afetadas pelo melasma de acordo com a escolaridade foi realizada pelo teste de Jonckheere-Terpstra.¹⁶

A correlação entre os componentes ancestrais entre si e com o número de topografias faciais afetadas foi estimada pelo coeficiente de correlação linear de Spearman (ρ). A comparação entre os componentes ancestrais e a ancestralidade referida dos sujeitos foi estimada pela curva ROC (área sob a curva = AUC), sua sensibilidade e especificidade.^{15,17}

Os componentes de ancestralidade foram tabulados e comparadas as porcentagens de cada grupo entre os casos e controles ou de acordo com o fototipo, ou escolaridade, por análise de variância multivariada (*MANOVA – Pillai's trace*), com análise *post hoc* de Bonferroni. Os componentes ancestrais foram normalizados a partir da transformação Log_{10} . A homoscedasticidade das amostras foi avaliada pelo teste de Levene.¹⁵

Foi desenvolvido um modelo comparativo entre casos e controles a partir de regressão logística múltipla condicional, em que a seleção das covariáveis dependeu da significância ($p < 0,2$) dentro de cada inclusão subsequente. A

dimensão de efeito foi estimada pela razão de chances (*Odds Ratio* - *OR*) e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%). As interações entre os termos finais do modelo foram testadas quanto ao seu efeito aditivo.^{18,19}

Para as análises multivariadas, dados faltantes (<10% da categoria) foram estimados por técnica de imputação múltipla com dez estimativas.²⁰

Posteriormente, foi realizada análise de sensibilidade dos resultados por duas técnicas: avaliação do desempenho do modelo logístico multivariado final sem os dados imputados, e avaliação das variáveis selecionadas por escalonamento multidimensional.

O dimensionamento amostral foi baseado em pré-teste com 100 casos e 100 controles e calculado para um modelo final de regressão logística múltipla, estimado seu “power” de 0,8 e nível alfa bilateral de 0,05, resultando na necessidade de 110 sujeitos em cada grupo.^{18,19}

Dados foram tabulados em MSEXcel 2007 para análise posterior pelo software SPSS 20.0.²¹ Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

Resultados

Foram avaliadas 119 mulheres com melasma facial e seus controles. As características clínicas das pacientes com melasma facial estão dispostas na tabela 1. Destacam-se a idade de início do melasma no menacme; gestação e exposição solar como os fatores desencadeantes mais prevalentes; e as topografias centropaciais como as mais afetadas.

Gravidez ocorreu em 92 (77%) casos, e melasma induzido por gestação foi referido por 48 (52%) pacientes que engravidaram.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes com melasma.

Variáveis	
Idade de início do melasma (anos)*	27,2 (8,3)
Fator desencadeante – N (%)	
Gestação	48 (40)
Exposição solar	44 (37)
CHO	26 (22)
TRH	2 (2)
Cosméticos / Tratamentos	7 (6)
Evento estressante	3 (3)
Outros	6 (5)
Topografia afetada – N (%)	
Zigomático	60 (50)
Frontal	48 (40)
Labial superior	44 (37)
Temporal	39 (33)
Mentoniana	25 (21)
Mandibular	22 (18)
Parotídea	20 (17)
Nasal	19 (16)
Glabelar	15 (13)
Número de áreas faciais afetadas#	3 (2-4)

* média (desvio padrão); # mediana (p25-p75).

CHO – Contraceptivo hormonal oral; TRH – Terapia de reposição hormonal

Os principais dados demográficos e de ancestralidade genética dos grupos estão listados na tabela 2. Destacam-se, entre os casos, maior frequência de

familiares de primeiro grau, histórico de gestação, exposição solar diária, baixa escolaridade, ancestralidades referidas e ancestralidades genéticas.

Houve contaminação das amostras de DNA em apenas duas amostras e apenas um sujeito negou-se a participar do estudo por conta da coleta.

Todos os sujeitos avaliados apresentaram mistura genética quanto a sua ancestralidade. A ascendência europeia foi predominante em ambos os grupos, seguido pelos componentes africano e ameríndio (Apêndice 2).

A figura 2 demonstra a distribuição de casos e controles quanto à composição das suas ancestralidades genéticas. Houve significativa diferença entre os componentes de ancestralidade entre os grupos, com variação significativa quanto às ascendências africana e europeia.

Houve forte correlação negativa entre os componentes europeu e africano ($\rho=-0,78$; $p<0,01$), moderada entre europeu e ameríndio ($\rho=-0,64$; $p<0,01$), e fraca entre os componentes ameríndio e africano ($\rho=0,15$; $p<0,05$) dos 238 sujeitos (Apêndice 3).

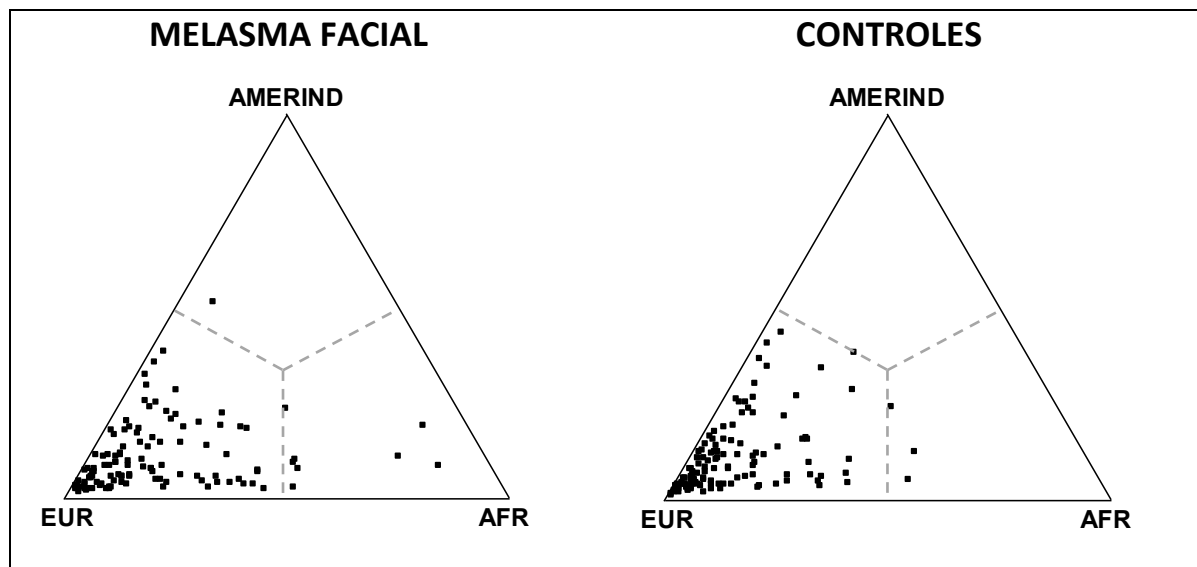
A ancestralidade referida pelos sujeitos não se associou com os componentes ancestrais genéticos. Houve fraco desempenho classificatório para a estimativa da composição ancestral genética africana (AUC=0,79, sensibilidade 75%, especificidade 73%), europeia (AUC=0,66, sensibilidade 83%, especificidade 46%) e ameríndia (AUC=0,54, sensibilidade 19% especificidade 91%) (Apêndice 4).

Tabela 2. Dados demográficos e de ancestralidade genômica dos grupos.

Variáveis		Melasma facial (n=119)	Controles (n=119)	Análise bivariada		Análise multivariada	
				Odds Ratio (IC 95%)	p	Odds Ratio (IC 95%)	p
Idade (anos)*		39,0 (8,2)	39,0 (9,7)	-	-	0,99 (0,95-1,02)	0,44
Fototipo – N (%)					0,09		0,13
	II	18 (15)	30 (25)	1,00 (-)		1,00 (-)	
	III	42 (35)	45 (38)	1,56 (0,76-3,20)		1,32 (0,57-3,02)	
	IV	46 (39)	30 (25)	2,56 (1,22-5,38)		1,40 (0,58-3,39)	
	V	13 (11)	14 (12)	1,55 (0,60-4,02)		0,39 (0,11-1,40)	
Escolaridade – N (%)					<0,01		0,01
	Fundamental	39 (33)	14 (12)	4,67 (2,24-9,73)		4,04 (1,62-10,11)	
	Médio	43 (36)	43 (36)	1,68 (0,93-3,01)		1,71 (0,85-3,44)	
	Superior	37 (31)	62 (52)	1,00 (-)		1,00 (-)	
História familiar (1º grau) – N (%)		67 (56)	27 (24)	3,10 (1,11-8,7)	0,03	3,04 (1,56-5,94)	<0,01
Idade da menarca (anos)*		12,8 (1,8)	12,7 (1,8)	1,01 (0,88-1,16)	0,92	-	-
Tempo de contraceptivo oral (anos)#		10 (3-15)	5 (1-12)	1,03 (0,98-1,07)	0,13	1,02 (0,98-1,07)	0,33
Exposição solar diária – N (%)		42 (44)	24 (27)	2,15 (1,16-3,99)	0,02	1,09 (0,57-2,10)	0,80
Histórico de gestação – N (%)		92 (77)	77 (65)	1,86 (1,05-3,29)	0,03	1,50 (0,69-3,29)	0,31
Uso de psicotrópicos – N (%)							
	Antidepressivos	28 (24)	18 (15)	1,73 (0,90-3,33)	0,10	2,96 (0,37-24,03)	0,31
	Ansiolíticos	11 (9)	5 (4)	2,32 (0,78-6,90)	0,12	-	-
Ancestralidade referida – N (%)							
	Europeia	74 (71)	88 (85)	0,42 (0,21-0,84)	0,01	-	-
	Ameríndia	40 (39)	25 (25)	1,96 (1,07-3,58)	0,03	-	-
	Africana	37 (35)	30 (29)	1,30 (0,73-2,33)	0,37	-	-
Ancestralidade genética (%)#							
	Componente europeu	77 (64-89)	82 (69-90)	0,98 (0,97-0,99)	0,04	-	-
	Componente ameríndio	7 (4-14)	7 (4-14)	1,00 (0,97-1,02)	0,72	-	-
	Componente africano	10 (4-21)	6 (4-16)	1,03 (1,01-1,05)	<0,01	1,04 (1,01-1,07)	<0,01

p (modelo)<0,01; p (constante)<0,05; Teste de Hosmer-Lemeshow: p=0,98; Classificação correta: 72%; R² de Nagelkerke: 0,31.

* média (desvio padrão); # mediana (p25-p75).

Figura 2. Diagrama ternário da composição genética ancestral dos grupos.

AMERIND – Ameríndio; EUR – Europeu; AFR – Africano.

Teste MANOVA (*Pillai's trace*) $p=0,04$.

Comparação *post-hoc* (Bonferroni): $p(\text{AFR}) < 0,01$; $p(\text{EUR}) = 0,05$; $p(\text{AMERIND}) = 0,86$.

O fenótipo pigmentar (fototipo de Fitzpatrick) associou-se à composição ancestral dos sujeitos, especialmente o componente da mistura interétnica europeia e africana ($p < 0,01$) (Apêndice 5).

Quando avaliados de forma multivariada (tabela 2), mostraram-se independentemente significativos para o desenvolvimento do melasma: a escolaridade, história familiar e ancestralidade africana. Foram identificadas interações significativas entre: uso de antidepressivo e história familiar de melasma ($\text{OR}=6,15$) (Apêndices 6 e 7). O modelo final não evidenciou *outliers* ($Z_{\text{res}} > 3$).

A análise de sensibilidade, por regressão logística sem os dados imputados ($n=180$), resultou semelhante ao modelo completo. Assim como o escalonamento multidimensional identificou as mesmas associações do modelo logístico (Apêndices 8 e 9).

A ancestralidade genética não apresentou associação com os fatores desencadeantes relatados pelos casos, história familiar, ou com a idade de surgimento da doença, porém, o acometimento da topografia zigomática se associou ao componente ameríndio ($p < 0,01$) (Apêndice 10).

O número de topografias faciais acometidas entre os casos foi menor em proporção ao grau de escolaridade (Apêndice 11) ($p < 0,01$), porém, correlacionou-se fracamente ao componente ancestral europeu ($\rho = -0,22$; $p = 0,02$).

Sujeitos com escolaridade superior, comparados à escolaridade fundamental, apresentaram maiores medianas dos componentes ancestrais europeus (84% vs 76%; $p < 0,01$), e menores medianas dos componentes africanos e ameríndios (5% vs 11% e 6% vs 9%; $p < 0,05$), sem diferença entre casos e controles (Apêndice 12).

Discussão

Elementos de ancestralidade genética africana, além de aspectos sociais (escolaridade), medicamentosos e de histórico familiar, compõem múltiplos fatores que se associaram independentemente ao desenvolvimento de melasma facial feminino, em uma população com alto grau de mistura genética.

As pacientes com melasma apresentaram características fenotípicas, clínicas e demográficas semelhantes à casuística brasileira: idade de início da doença durante a segunda e quarta décadas, desencadeada principalmente por exposição solar e estímulos hormonais (gestação e CHO), acometimento preferencialmente centrofacial e alta frequência de acometimento familiar.^{2,22}

A origem ancestral pode se associar a diferentes padrões de resposta imunológica, processos metabólicos, resposta do hospedeiro à infecção e terapêutica farmacológica, o que justifica a investigação de componentes ancestrais em estudos clínicos de populações altamente miscigenadas.²³⁻²⁷

Ancestralidade ameríndia foi associada a menor risco de hanseníase,²⁸ assim como menor risco de doença de Alzheimer,²⁹ mas maior risco de lupus eritematoso sistêmico.^{30,31} Ancestralidade europeia associou-se a maior risco de neuromielite óptica e esclerose múltipla,³² da mesma forma que apneia do sono³³ e morte por insuficiência cardíaca.³⁴ Obesidade compartilha genes de origem africana,³⁵ assim como asma e níveis de IgE.³⁶

A autodeclaração da ancestralidade e elementos fenotípicos do indivíduo não são confiáveis na avaliação da ancestralidade genética.^{14,37,38} Em nosso estudo, a ancestralidade referida não categorizou com sensibilidade os componentes ancestrais.

O Brasil, especialmente a região estudada, apresenta elevada taxa de miscigenação, especialmente indígena, europeia e africana.³⁹ A pigmentação cutânea apresenta herança poligênica, e vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes do sistema pigmentar foram identificados com padrões de ocorrência em diferentes grupos ancestrais, além disso, populações de origem africana tendem a perpetuar genes do sistema pigmentar.^{6-8,40}

Melasma é menos prevalente entre europeus, e mais frequente entre asiáticos e latino-americanos, grupos que têm origem filogenética comum decorrentes de migrações da humanidade a partir da África.^{41,42} Hipoteticamente, melasma poderia resultar de mosaicismos genéticos do sistema pigmentar,

expressando localmente, genes de ancestrais africanos em meio ao padrão pigmentar europeu ou asiático.

Em estudo de ancestralidade genética do sistema pigmentar da epiderme, evidenciaram-se semelhanças entre os padrões de expressão europeus e asiáticos, que diferem em comparação ao africano. Além disso, os autores salientam que a pigmentação deriva de uma complexa interação celular em que um grande contingente de genes e fatores reguladores não são completamente compreendidos, como NINL, S100A4, H19, WIF-1, PDZK1, esteroides sexuais e miRNA-675.⁴³⁻⁴⁹

Outro elemento que fortalece essa hipótese decorre das semelhanças histopatológicas encontradas na pele com melasma em comparação aos achados da pele negra. Não há diferença quanto à quantidade de melanócitos, mas na quantidade e qualidade da melanina entre indivíduos caucasoides e negroides. A pele negroide tem melanossomos grandes, não agregados, com número aumentado na camada basal e distribuídos por todas as camadas da epiderme.⁵⁰⁻⁵² O extrato córneo da pele negra possui menos lipídeos, e a derme tem a mesma espessura da pele caucasóide, porém os fibroblastos e os macrófagos são maiores, em maior número e hiperativos.^{50,53-55}

De forma análoga, as características histopatológicas da pele negroide, como os melanossomos mais maduros, maior celularidade dérmica e a camada lipídica diminuída também estão presentes na pele de pacientes com melasma. Ainda, após a exposição solar, a pele com melasma promove uma reação pigmentar mais intensa que a pele adjacente, tal qual ocorre entre fenótipos negroides, em comparação aos caucasóides.⁵³

A regulação e controle da expressão desses genes alterados e em mosaico pode ser mediada epigeneticamente por fatores ambientais, como a radiação ultravioleta (RUV), esteroides sexuais e medicamentos.⁵⁶⁻⁶¹

Em estudo com células tronco pluripotentes derivadas de fibroblastos da pele, houve variação entre as células-cópias, demonstrando a existência de mosaicismo genético entre elas, o que significa que a pele pode apresentar mosaico genético, com possível comportamento individualizado de seus clones.⁶²

A inclusão do componente ancestral africano, da história familiar e dos níveis de escolaridade no modelo multivariado, suplantou variáveis epidemiologicamente importantes como a gestação e tempo de uso de CHO, evidenciando que esses elementos possam ser primordiais ao desenvolvimento da doença.⁵ Cada ponto percentual do componente genético africano, aumentou em 4% a chance de melasma.

Não há informação sobre a prevalência de melasma em diferentes níveis sociais e de renda familiar. Porém, a baixa escolaridade está associada a menor nível sócio-econômico, maior morbimortalidade, menor informação sobre prevenção de doenças e menores cuidados à saúde.⁶³ Dessa forma, pode-se hipotetizar que pacientes com melasma e baixa escolaridade sejam menos adeptos a práticas de proteção solar, provavelmente pela falta de informação sobre prevenção e pelo custo dos fotoprotetores; desloquem-se expostos ao sol nos trajetos do dia-a-dia, e também tenham como profissão trabalhos que exijam menor grau de instrução, mais expostos à RUV.

Nosso estudo evidenciou que o número de topografias faciais acometidas pela doença é menor em proporção ao grau de estudo, o que pode subsidiar essa

hipótese. Além disso, maior escolaridade associou-se a menores componentes ancestrais africanos e ameríndios, em contraposição à ancestralidade europeia. Entretanto, no modelo multivariado, baixa escolaridade e ancestralidade africana foram variáveis independentemente associadas aos casos. Novos estudos devem avaliar, além da escolaridade, a associação entre renda familiar com melasma e seus índices de gravidade.

Estudos observacionais são sujeitos a vieses de memória e de informação, que, neste caso, pode ter ocorrido quanto à história familiar, ascendência referida, uso de medicamentos, tempo de uso de CHO e exposição solar diária. Acredita-se que tenha havido imprecisão em proporções semelhantes das informações entre casos e controles, o que minimiza seu impacto nos resultados finais.

A generalização dos resultados deste estudo é prejudicada pelo fato de casos e controles serem oriundos de serviço público do interior do Brasil, porém, a homogeneidade dos grupos quanto à origem geográfica e social dos pacientes, garante a comparabilidade entre eles. Da mesma forma, a exclusão de asiáticos e de fototipos extremos (I e VI), que se associam especialmente às ancestralidades europeia e africana, maximizaram a exploração de casos e controles com maior grau de mistura genética, o que fortalece a validade interna dos resultados.

Nossos resultados devem ser também confirmados em pacientes com melasma extrafacial, em homens e em outras populações com diferentes componentes genéticos ancestrais (p.ex: Oriente Médio, Oceania e Ásia do Leste).

Referências

1. Handel AC, Miot LD, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol* 2014;89:771-82.
2. 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;27:151-6.
3. 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;22:655-62.
4. Shriver MD, Smith MW, Jin L, et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 1997;60:957-64.
5. 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;171:588-94.
6. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 2009;18:R9-17.
7. Quillen EE, Bauchet M, Bigham AW, et al. OPRM1 and EGFR contribute to skin pigmentation differences between Indigenous Americans and Europeans. *Hum Genet* 2012;131:1073-80.
8. Lao O, de Gruijter JM, van Duijn K, Navarro A, Kayser M. Signatures of positive selection in genes associated with human skin pigmentation as revealed from analyses of single nucleotide polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2007;71:354-69.
9. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000;67:444-61.
10. Ribeiro D. O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. In. 2nd ed. São Paulo: Companhia das Letras; 1995.
11. QIAGEN Sample & Assay Technologies. 2014. (Accessed 11/12/2014, 2014, at <http://www.qiagen.com/br/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-investigator-kit>.)
12. Resque RL, Freitas Ndo S, Rodrigues EM, et al. Estimates of interethnic admixture in the Brazilian population using a panel of 24 X-linked insertion/deletion markers. *Am J Hum Biol* 2010;22:849-52.
13. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010;31:184-90.
14. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS ONE* 2013;8:e62005.
15. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics: the bare essentials: Bc Decker Hamilton, Ontario; 2008.
16. Weller EA, Ryan LM. Testing for trend with count data. *Biometrics* 1998;54:762-73.
17. Rao G. What is an ROC curve? *J Fam Pract* 2003;52:695.
18. Bagley SC, White H, Golomb BA. Logistic regression in the medical literature: Standards for use and reporting, with particular attention to one medical domain. *J Clin Epidemiol* 2001;54:979-85.
19. Katz MH. Multivariable analysis: a practical guide for clinicians: Cambridge university press; 2006.
20. Mackinnon A. The use and reporting of multiple imputation in medical research—a review. *J Int Med* 2010;268:586-93.
21. SPSS. IBM SPSS Statistics Base 20. Chicago, IL 2011.
22. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol* 2013.
23. Sortica Vde A, Ojopi EB, Genro JP, et al. Influence of genomic ancestry on the distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 gene polymorphisms among Brazilians. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110:460-8.
24. Suarez-Kurtz G, Pena SD. Pharmacogenomics in the Americas: the impact of genetic admixture. *Curr Drug Targets* 2006;7:1649-58.
25. Suarez-Kurtz G, Botton MR. Pharmacogenetics of coumarin anticoagulants in Brazilians. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;11:67-79.

26. Shim JK, Ackerman SL, Darling KW, Hiatt RA, Lee SS. Race and ancestry in the age of inclusion: technique and meaning in post-genomic science. *J Health Soc Behav* 2014;55:504-18.
27. Franceschini N, Chasman DI, Cooper-DeHoff RM, Arnett DK. Genetics, ancestry, and hypertension: implications for targeted antihypertensive therapies. *Curr Hypertens Rep* 2014;16:461.
28. Garcia P, Alencar D, Pinto P, et al. Haplotypes of the IL10 gene as potential protection factors in leprosy patients. *Clin Vaccine Immunol* 2013;20:1599-603.
29. Benedet AL, Moraes CF, Camargos EF, et al. Amerindian genetic ancestry protects against Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2012;33:311-7.
30. Sanchez E, Webb RD, Rasmussen A, et al. Genetically determined Amerindian ancestry correlates with increased frequency of risk alleles for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010;62:3722-9.
31. Seldin MF, Qi L, Scherbarth HR, et al. Amerindian ancestry in Argentina is associated with increased risk for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2008;9:389-93.
32. Brum DG, Luizon MR, Santos AC, et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. *PLoS ONE* 2013;8:e58925.
33. Guindalini C, Colugnati FA, Pellegrino R, Santos-Silva R, Bittencourt LR, Tufik S. Influence of genetic ancestry on the risk of obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 2010;36:834-41.
34. Cardena MM, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Amerindian genetic ancestry is associated with higher survival rates compared to African and European ancestry in Brazilian patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2014;176:527-8.
35. Fernandez JR, Shiver MD. Using genetic admixture to study the biology of obesity traits and to map genes in admixed populations. *Nutr Rev* 2004;62:S69-74.
36. Vergara C, Caraballo L, Mercado D, et al. African ancestry is associated with risk of asthma and high total serum IgE in a population from the Caribbean Coast of Colombia. *Hum Genet* 2009;125:565-79.
37. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE* 2011;6:e17063.
38. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177-82.
39. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 2011;20:111-6.
40. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet* 2003;112:387-99.
41. Henn BM, Cavalli-Sforza L, Feldman MW. The great human expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:17758-64.
42. Falush D, Wirth T, Linz B, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003;299:1582-5.
43. Yin L, Coelho SG, Ebsen D, et al. Epidermal gene expression and ethnic pigmentation variations among individuals of Asian, European and African ancestry. *Exp Dermatol* 2014;23:731-5.
44. Kim NH, Lee CH, Lee AY. H19 RNA downregulation stimulated melanogenesis in melasma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:84-92.
45. Kim JY, Lee TR, Lee AY. Reduced WIF-1 expression stimulates skin hyperpigmentation in patients with melasma. *J Invest Dermatol* 2013;133:191-200.
46. 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;131:1692-700.
47. 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;134:2967-76.
48. Chung BY, Noh TK, Yang SH, et al. Gene Expression Profiling in Melasma in Korean Women. *Dermatology* 2014;333-42.
49. Kim NH, Cheong KA, Lee TR, Lee AY. PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in melasma. *J Invest Dermatol* 2012;132:2622-31.
50. Alchorne MMA, Abreu MAMM. Dermatologia na pele negra. *An Bras Dermatol* 2008;83:7-20.
51. Sturm RA, Box NF, Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* 1998;20:712-21.
52. Miot LD, Miot HA, Silva MG, Marques ME. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol* 2009;84:623-35.

53. Lee DJ, Lee J, Ha J, Park KC, Ortonne JP, Kang HY. Defective barrier function in melasma skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:1533-7.
54. Muizzuddin N, Hellemans L, Van Overloop L, Corstjens H, Declercq L, Maes D. Structural and functional differences in barrier properties of African American, Caucasian and East Asian skin. *J Dermatol Sci* 2010;59:123-8.
55. Langton AK, Sherratt MJ, Sellers WI, Griffiths CEM, Watson REB. Geographical ancestry is a key determinant of epidermal morphology and dermal composition. *Brit J Dermatol* 2014;171:274-82.
56. Has C. Mosaicism in the skin: the importance of mild or minimal skin lesions. *Arch Dermatol* 2011;147:1094-6.
57. Happle R. Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol* 1993;129:1460-70.
58. Kouzak SS, Mendes MS, Costa IM. Cutaneous mosaicisms: concepts, patterns and classifications. *An Bras Dermatol* 2013;88:507-17.
59. Cheng JB, Cho RJ. Genetics and epigenetics of the skin meet deep sequence. *J Invest Dermatol* 2012;132:923-32.
60. Hughes MW, Lu W, Chuong CM. Nuclear topology, epigenetics, and keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2013;133:2130-3.
61. Millington GW. Epigenetics and dermatological disease. *Pharmacogenomics* 2008;9:1835-50.
62. Abyzov A, Mariani J, Palejev D, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012;492:438-42.
63. Lynch JW, Smith GD, Kaplan GA, House JS. Income inequality and mortality: importance to health of individual income, psychosocial environment, or material conditions. *BMJ* 2000;320:1200-4.

4. CONCLUSÕES

Houve associação entre o componente ancestral genético africano e melasma facial em mulheres brasileiras de fototipos II a V.

Foram descritas características clínicas e demográficas de mulheres portadoras de melasma facial que se assemelharam à casuística nacional.

A ancestralidade genética não apresentou associação com os fatores desencadeantes, ou com a idade de surgimento do melasma. Quanto à topografia afetada, o acometimento zigomático em pacientes associou-se ao maior componente ancestral ameríndio.

História familiar de primeiro grau, baixa escolaridade, uso de psicotrópicos entre pacientes com história familiar de melasma e componente ancestral genético africano, associaram-se, de forma independente dos demais fatores de risco conhecidos, ao melasma facial.

5. PERSPECTIVAS

Melasma é queixa comum na prática dermatológica, e, até o momento, os tratamentos são voltados à via final da síntese e distribuição de melanina. O fato do tratamento não atingir a causa da doença é uma das razões que provavelmente levam a falhas terapêuticas e recidivas. Esse aspecto, associado ao acometimento de áreas visíveis, curso crônico, em, principalmente, mulheres na menacme, inflige grande impacto na sua qualidade de vida. 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. Quanto mais se investiga sobre as vias de pigmentação, genética e o efeito dos fatores ambientais na doença, emergem, não somente novos conceitos sobre pigmentação melânica, mas também novas dúvidas sobre sua regulação. Nosso estudo contribuiu para maior conhecimento dos aspectos genéticos e epidemiológicos envolvidos, sugerindo a identificação de grupos susceptíveis, ligados a componentes ancestrais.

O modelo proposto neste trabalho, que hipotetiza a miscigenação africana como vetor de genes pigmentares, e que se manifestariam em mosaico na pele, facilitados 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.

A melanogênese depende da atividade integrada da unidade epidermo-melânica e sofre influência de fibroblastos, endotélio e células inflamatórias. O

melanócito seria o principal candidato ao mosaicismo proposto, que, submetido a estímulo ambiental e alteração epigenética pela RUV, inflamação, estresse, medicamentos e hormônios sexuais exógenos, expressaria padrão tipo *checkerboard* (mosaicismo tipo 2).

O sequenciamento genético e a identificação de SNPs entre melanócitos de pele com melasma e adjacente, explorando genes do sistema pigmentar que configurem diferenças ancestrais entre europeus, ameríndios e africanos (p.ex.: MC1-R, ASIP, OCA2, SLC24A5, SLC45A2, TYR, MITF, WIF-1 e H19, OPRM1 e EGFR) pode ser o primeiro passo para essa confirmação. O domínio recente pelo nosso grupo da cultura primária de melanócitos da face a partir de diminutos fragmentos de pele permitirá esse experimento brevemente.

Estudos recentes que exploraram o genoma da pele com melasma e pele sã adjacente 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. A cultura primária de cada uma dessas populações deve ser analisada separadamente para conclusões mais robustas.

Caso se confirmem as mutações em mosaico dos melanócitos, 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 pigmentar ancestral 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; que também podem ser 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 filogenética da pigmentação em mamíferos devem substanciar o modelo proposto para explicar as diferenças fenotípicas encontradas no melasma.

A exclusividade do acometimento de áreas fotoexpostas, a piora clínica (extensão e intensidade) após a exposição solar e a efetiva prevenção do melasma gestacional pelo uso de filtros solares são indicadores da necessidade de estudo do papel da RUV como indutora de mutações e controle epigenético da pigmentação. Além disso, o papel das diferentes radiações UVA, UVB, infravermelha e luz visível deve ser avaliada.

Os 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 sistema endócrino do 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 o complexo epidermomelânico seria importante, já que queratinócitos da pele com melasma apresentam maior expressão de receptores de estrogênio.

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

A via de crescimento celular WNT foi recentemente implicada na pigmentação cutânea. É necessário investigar de forma comparativa a atividade da via WNT e a expressão do seu inibidor (WIF-1) nos queratinócitos e fibroblastos de pele sã e lesada, no melasma.

O gene H19 e seu produto miRNA-675, podem agir na regulação da melanogênese a partir da interação com a caderina 11, com função inibitória do gene MITF. Essa hipótese ainda carece de comprovação de forma comparativa na pele com melasma e adjacente.

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 ablativas, como a remoção da epiderme da face a partir de dermoabrasão ou por bolhas induzidas por sucção, visando a substituição da unidade epidermo-melânica pelo repovoamento, advindo dos folículos, devem ser também validada, gerando menor risco de cicatrizes e fornecendo maior número de melanócitos para cultura.

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, antidepressivos inibidores da recaptção de serotonina e a progressiva miscigenação da população mundial. Se essas hipóteses estiverem corretas, espera-se um progressivo aumento da sua incidência.

A investigação dos diagnósticos de casos novos em serviço de referência, com intervalo de uma geração, pode indicar 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.

6. APÊNDICES

Apêndice 1. Formulário semiestruturado: informações clínico-epidemiológicas.

Formulário para coleta de dados

☐ Caso

☐ Controle

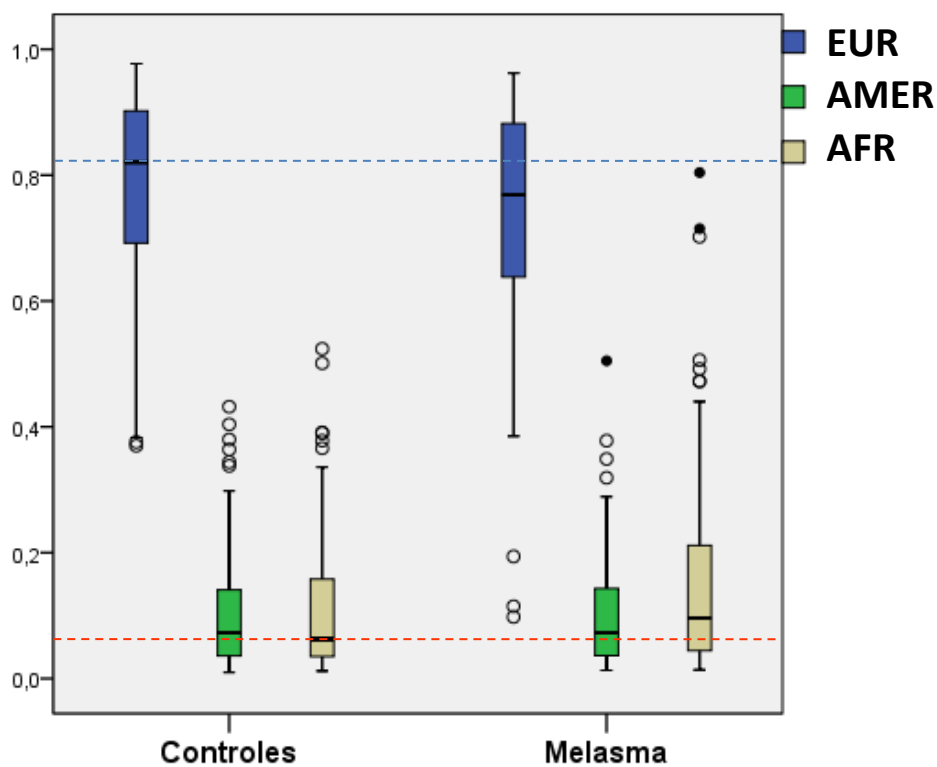
Data: __/__/__

“AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ANCESTRALIDADE EM MULHERES COM MELASMA FACIAL: UM ESTUDO TRANSVERSAL.”

Dra. Maria Paula Barbieri D'Elia

☐ Concordo em participar do estudo (Termo de Consentimento Assinado)

Nome: _____	RG-HC: _____	Data nascimento: __/__/__
Telefone para contato: _____	Escolaridade: _____	
Profissão: _____	Exposição solar diária: _____	
Ascendência familiar referida: ☐ Europeia ☐ Africana ☐ Indígena ☒ Asiática		
Cor dos olhos: ☐ escuro ☐ azul/verde Cor do cabelo: ☐ claro ☐ escuro		
AO TOMAR SOL SEM PROTEÇÃO SOLAR:		
Bronzeia a pele: ☐ sempre ☐ às vezes ☐ nunca		
Queima a pele: ☐ sempre ☐ às vezes ☐ nunca		
Fototipo de Fitzpatrick: ☒ I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V ☒ VI		
Idade de início do melasma: _____		
Usa FPS: ☐ sim ☐ não Qual FPS? _____ Há quantos anos: _____		
Topografia acometida: ☐ zigoma ☐ frontal ☐ glabella ☐ nasal ☐ labial superior ☐ temporal ☐ mento ☐ mandibular ☐ parotídeo ☐ outro _____		
Fator desencadeante: ☐ anticoncepcional hormonal ☐ terapia reposição hormonal ☐ gestação ☐ exposição solar ☐ outro _____		
História Familiar: ☐ não ☐ mãe/pai ☐ irmãos ☐ primos ☐ outro _____		
Menarca: _____ G ____ P ____ C ____ A ____		
Uso de anticoncepcional hormonal: ☐ sim ☐ não Qual? ☐ oral ☐ injetável ☐ outro: _____ (ex: anel, DIU)		
Tempo de uso de ACO: _____		
Antecedentes pessoais:		
Uso de medicamentos: ☐ sim ☐ não Qual(is)? _____		
Coleta de material: ☐ sim ☐ não		
Observações: _____		

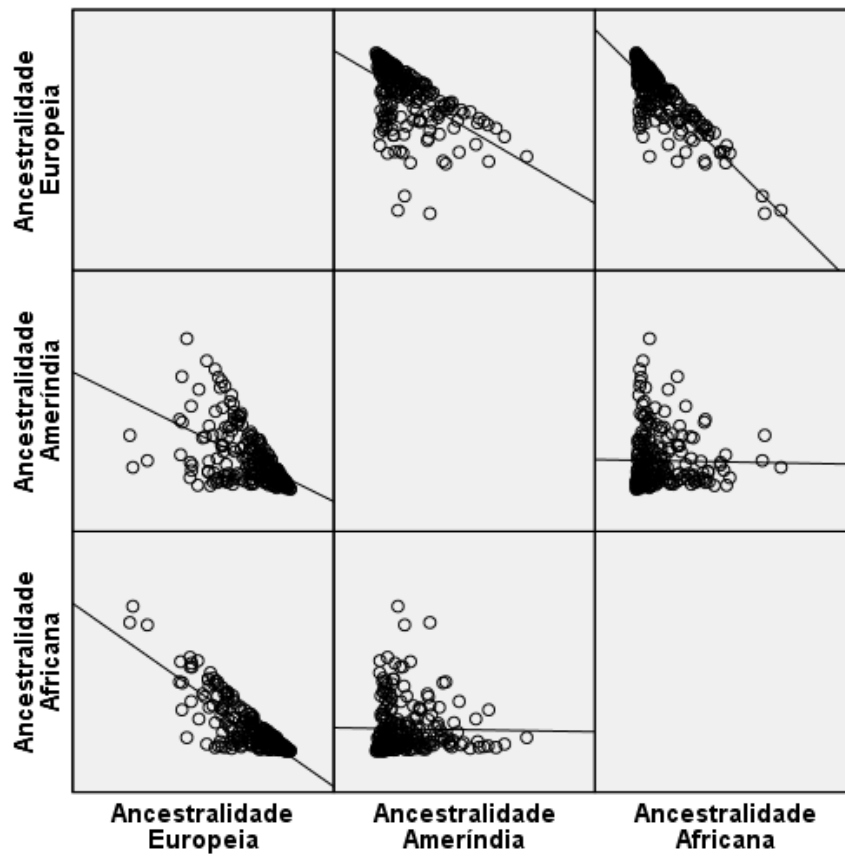
Apêndice 2. Componente ancestral genético dos sujeitos.

AMER – Ameríndio; EUR – Europeu; AFR – Africano

Teste MANOVA (*Pillai's trace*) $p=0,04$. (Componentes em Log_{10})

Comparação *post-hoc* (Bonferroni): $p(\text{AFR}) < 0,01$; $p(\text{EUR}) = 0,05$; $p(\text{AMERIND}) = 0,86$

Apêndice 3. Matriz de dispersão entre os componentes ancestrais de casos e controles.

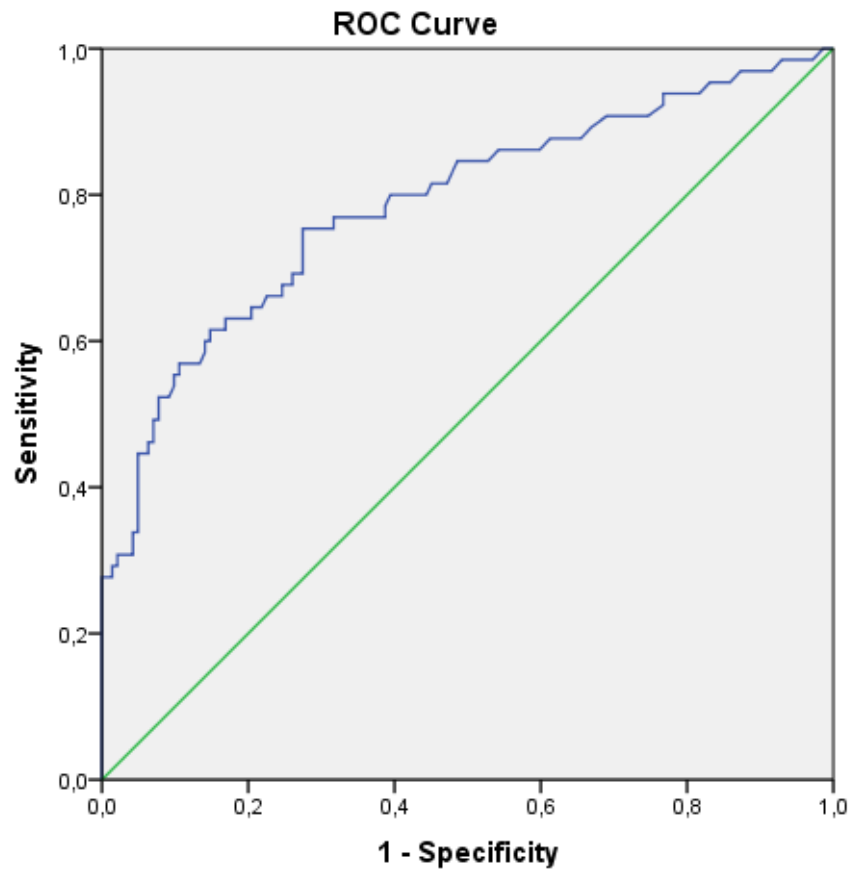


Correlação entre os componentes de ancestralidade (rho de Spearman).

	Europeia	Ameríndia	Africana
Europeia	1	-0,64**	-0,78**
Ameríndia		1 (-)	-0,15*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

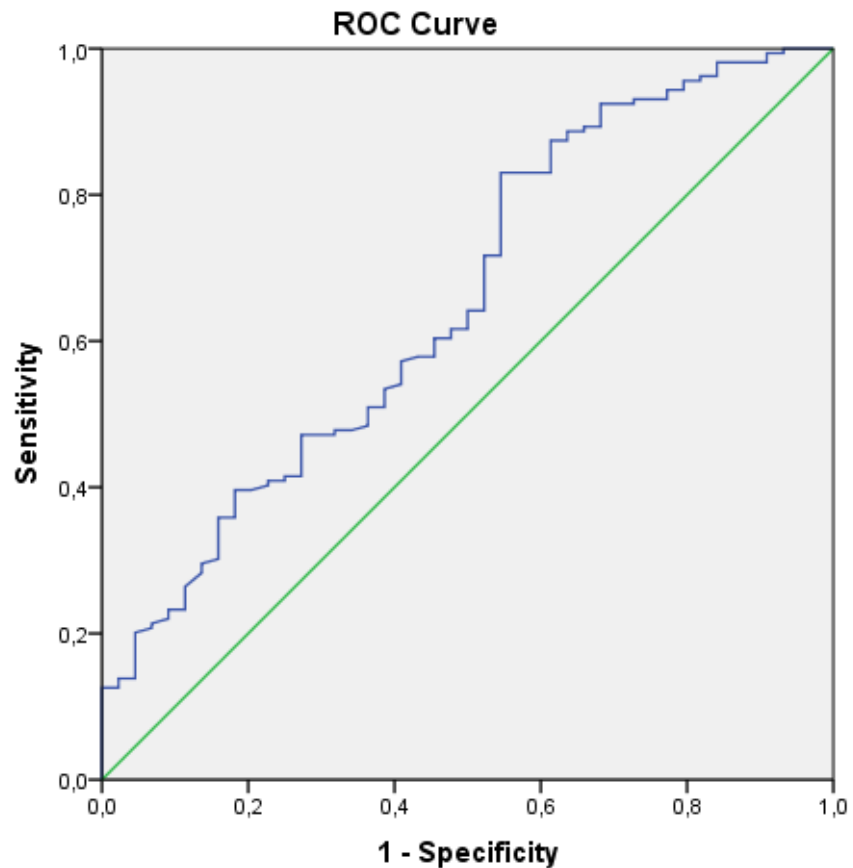
Apêndice 4. Curva ROC. Desempenho classificatório para a estimativa da composição ancestral genética vs referida: AFRICANA.



Diagonal segments are produced by ties.

AUC=0,79, sensibilidade 75%, especificidade 73%

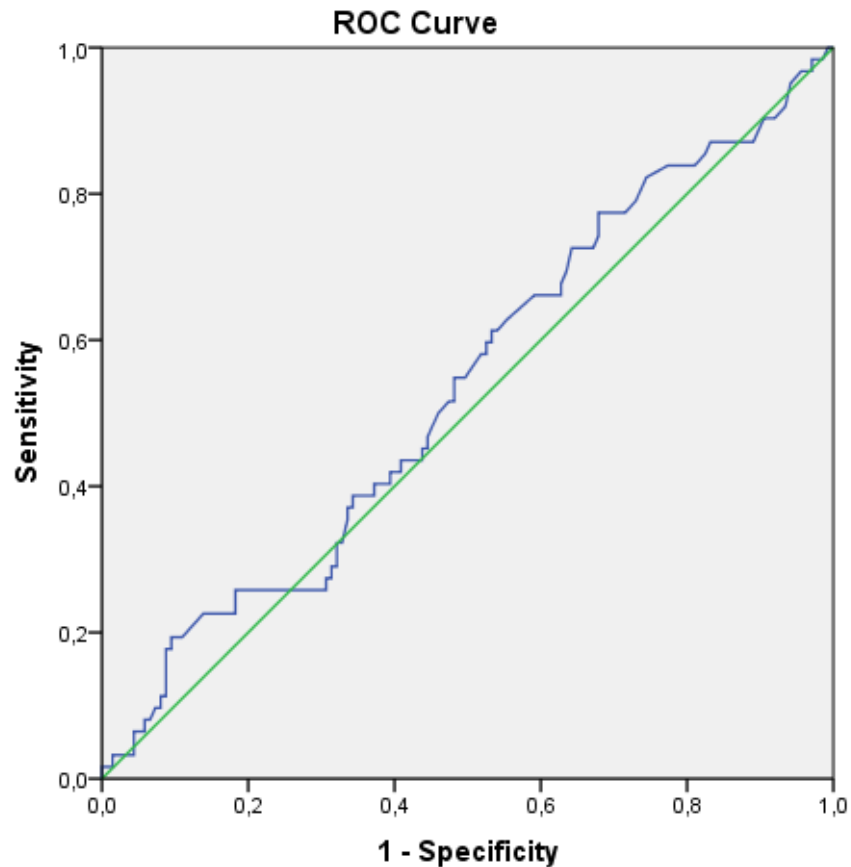
Curva ROC. Desempenho classificatório para a estimativa da composição ancestral genética vs referida: EUROPEIA.



Diagonal segments are produced by ties.

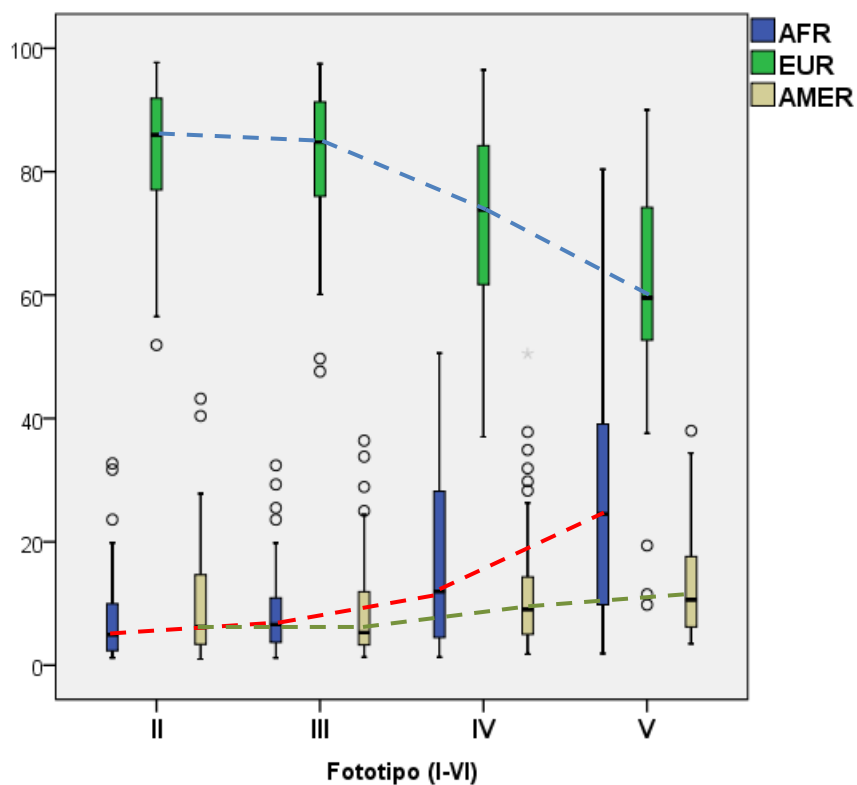
AUC=0,66, sensibilidade 83%, especificidade 46%

Curva ROC. Desempenho classificatório para a estimativa da composição ancestral genética vs referida: AMERÍNDIA.



Diagonal segments are produced by ties.

AUC=0,54, sensibilidade 19% especificidade 91%

Apêndice 5. Distribuições dos componentes ancestrais entre os fototipos.

AMER – Ameríndio; EUR – Europeu; AFR – Africano

Teste MANOVA (*Pillai's trace*) $p < 0,01$ (Componentes em Log_{10})

Comparação *post-hoc* (Bonferroni): $p(\text{AFR}) < 0,01$; $p(\text{EUR}) < 0,01$; $p(\text{AMERIND}) = 0,01$

Apêndice 6. Modelo final logístico multivariado.**Case Processing Summary**

Unweighted Cases ^a		N	Percent
Selected Cases	Included in Analysis	238	100,0
	Missing Cases	0	,0
	Total	238	100,0
Unselected Cases		0	,0
Total		238	100,0

a. If weight is in effect, see classification table for the total number of cases.

Dependent Variable Encoding

Original Value	Internal Value
Controles	0
Melasma	1

Categorical Variables Codings

		Frequency	Parameter coding		
			(1)	(2)	(3)
Fototipo (I-VI)	2	48	,000	,000	,000
	3	87	1,000	,000	,000
	4	76	,000	1,000	,000
	5	27	,000	,000	1,000
Escolaridade	1	53	1,000	,000	
	2	86	,000	1,000	
	3	99	,000	,000	
Exposição solar diária	Não	128	,000		
	Sim	110	1,000		
História familiar (1o grau)	Não	142	,000		
	Sim	96	1,000		
Gestou?	1	69	,000		
	2	169	1,000		
Antidepressivos	Não	192	,000		
	Sim	46	1,000		

Classification Table^{a,b}

	Observed	Predicted		
		Grupo		Percentage
		Controles	Melasma	Correct
Step 0	Grupo Controles	0	119	,0
	Melasma	0	119	100,0
	Overall Percentage			50,0

a. Constant is included in the model.

b. The cut value is ,500

Variables not in the Equation

		Score	df	Sig.
Step 0	Idade	,183	1	,669
	Fototipo	6,509	3	,089
	Fototipo(1)	,163	1	,686
	Fototipo(2)	4,949	1	,026
	Fototipo(3)	,042	1	,838
	HFMelasma1G(1)	25,211	1	,000
	Escolar	18,106	2	,000
	Escolar(1)	15,171	1	,000
	Escolar(2)	,000	1	1,000
	ExpSolar(1)	6,761	1	,009
	TempoACO	1,691	1	,194
	GESTOU(1)	4,592	1	,032
	AntiDepr(1)	2,695	1	,101
	CEMAfr	7,165	1	,007
	AntiDepr(1) by HFMelasma1G(1)	12,917	1	,000
	AntiDepr(1) by GESTOU(1)	1,127	1	,288
	Overall Statistics	56,654	14	,000

Omnibus Tests of Model Coefficients

		Chi-square	df	Sig.
Step		63,372	14	,000
Step 1	Block	63,372	14	,000
	Model	63,372	14	,000

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	266,566 ^a	,234	,312

a. Estimation terminated at iteration number 5 because parameter estimates changed by less than ,001.

Hosmer and Lemeshow Test

Step	Chi-square	df	Sig.
1	1,739	8	,988

Contingency Table for Hosmer and Lemeshow Test

	Grupo = Controles		Grupo = Melasma		Total	
	Observed	Expected	Observed	Expected		
Step 1	1	21	20,289	3	3,711	24
	2	19	19,019	5	4,981	24
	3	17	17,272	7	6,728	24
	4	15	15,301	9	8,699	24
	5	13	13,445	11	10,555	24
	6	13	11,334	11	12,666	24
	7	7	9,164	17	14,836	24
	8	8	7,000	16	17,000	24
	9	4	4,247	20	19,753	24
	10	2	1,930	20	20,070	22

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Grupo		Percentage
		Controles	Melasma	Correct
Step 1	Grupo Controles	88	31	73,9
	Melasma	36	83	69,7
	Overall Percentage			71,8

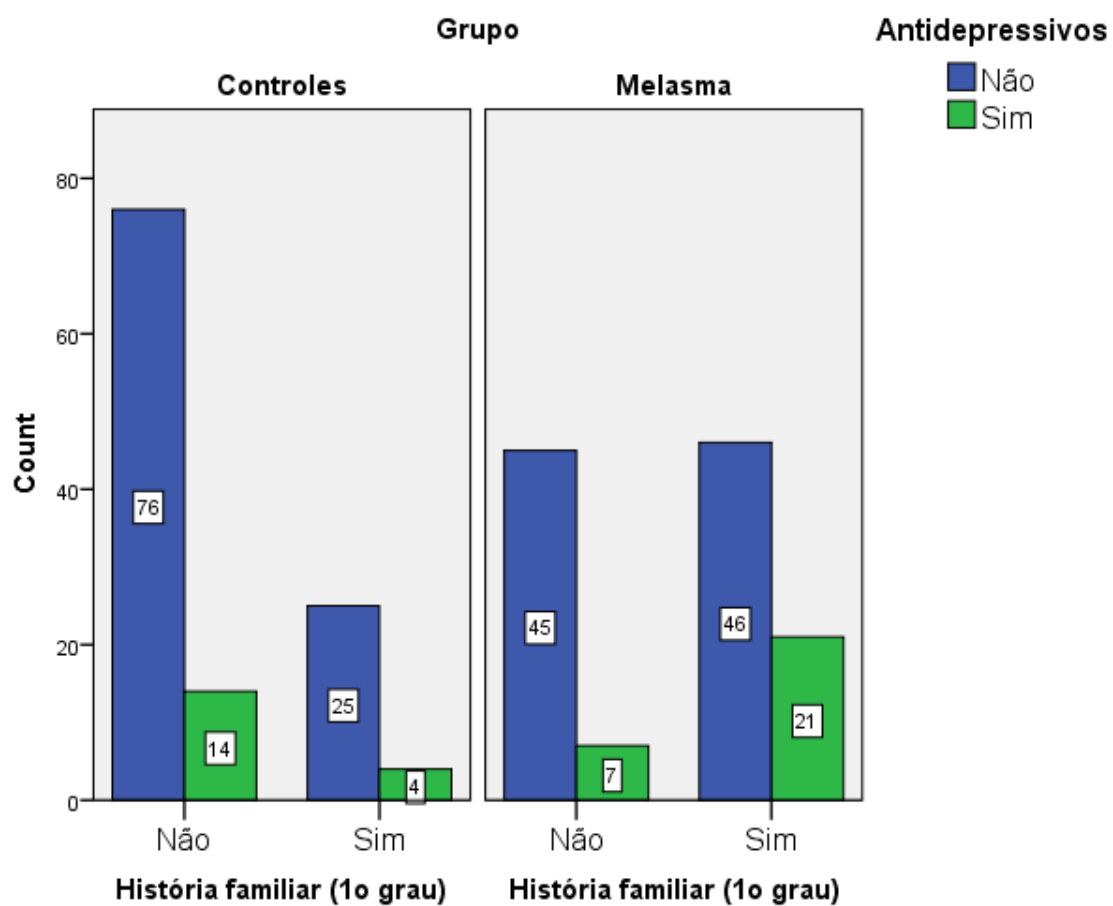
a. The cut value is ,500

Variables in the Equation						
	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
					Lower	Upper
Idade	,591	1	,442	,986	,952	1,022
Fototipo	5,659	3	,129			
Fototipo(1)	,419	1	,518	1,316	,573	3,020
Fototipo(2)	,565	1	,452	1,401	,581	3,378
Fototipo(3)	2,083	1	,149	,390	,109	1,401
HFMelasma1G(1)	10,609	1	,001	3,041	1,557	5,937
Escolar	8,941	2	,011			
Escolar(1)	8,938	1	,003	4,044	1,618	10,108
Escolar(2)	2,225	1	,136	1,706	,846	3,440
Step 1 ^a ExpSolar(1)	,064	1	,800	1,088	,565	2,096
TempoACO	,942	1	,332	1,021	,979	1,066
GESTOU(1)	1,038	1	,308	1,503	,686	3,290
AntiDepr(1)	1,035	1	,309	2,963	,365	24,029
CEMAfr	7,342	1	,007	1,038	1,010	1,067
AntiDepr(1) by HFMelasma1G(1)	4,423	1	,035	6,145	1,132	33,368
AntiDepr(1) by GESTOU(1)	2,894	1	,089	,139	,014	1,351
Constant	3,980	1	,046	,212		

Casewise List^a

--

a. The casewise plot is not produced because no outliers were found.

Apêndice 7. Interação entre uso de antidepressivo e história familiar de melasma.

Apêndice 8. Análise de sensibilidade. Modelo final logístico multivariado sem as imputações (N=180).

Case Processing Summary

Unweighted Cases ^a		N	Percent
Selected Cases	Included in Analysis	180	75,6
	Missing Cases	58	24,4
	Total	238	100,0
Unselected Cases		0	,0
Total		238	100,0

a. If weight is in effect, see classification table for the total number of cases.

Dependent Variable Encoding

Original Value	Internal Value
Controles	0
Melasma	1

Categorical Variables Codings

		Frequency	Parameter coding		
			(1)	(2)	(3)
Fototipo (I-VI)	2	41	,000	,000	,000
	3	67	1,000	,000	,000
	4	54	,000	1,000	,000
	5	18	,000	,000	1,000
Escolaridade	1	36	1,000	,000	
	2	66	,000	1,000	
	3	78	,000	,000	
Exposição solar diária	Não	116	,000		
	Sim	64	1,000		
História familiar (1o grau)	Não	105	,000		
	Sim	75	1,000		
Gestou?	1	54	,000		
	2	126	1,000		
Antidepressivos	Não	142	,000		
	Sim	38	1,000		

Classification Table^{a,b}

	Observed	Predicted		
		Grupo		Percentage
		Controles	Melasma	Correct
Step 0	Grupo Controles	0	86	,0
	Melasma	0	94	100,0
	Overall Percentage			52,2

a. Constant is included in the model.

b. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0 Constant	,089	,149	,355	1	,551	1,093

Variables not in the Equation

		Score	df	Sig.
Step 0	Idade	,150	1	,698
	Fototipo	10,023	3	,018
	Fototipo(1)	,093	1	,760
	Fototipo(2)	6,451	1	,011
	Fototipo(3)	,089	1	,765
	HFMelasma1G(1)	20,157	1	,000
	Escolar	15,025	2	,001
	Escolar(1)	14,479	1	,000
	Escolar(2)	,583	1	,445
	ExpSolar(1)	5,580	1	,018
	TempoACO	1,094	1	,296
	GESTOU(1)	4,076	1	,044
	AntiDepr(1)	1,331	1	,249
	CEMAfr	7,738	1	,005
	AntiDepr(1) by HFMelasma1G(1)	12,870	1	,000
	AntiDepr(1) by GESTOU(1)	,798	1	,372
	Overall Statistics	51,210	14	,000

Omnibus Tests of Model Coefficients

		Chi-square	df	Sig.
Step 1	Step	60,274	14	,000
	Block	60,274	14	,000
	Model	60,274	14	,000

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	188,903 ^a	,285	,380

a. Estimation terminated at iteration number 5 because parameter estimates changed by less than ,001.

Hosmer and Lemeshow Test

Step	Chi-square	df	Sig.
1	4,808	8	,778

Contingency Table for Hosmer and Lemeshow Test

		Grupo = Controles		Grupo = Melasma		Total
		Observed	Expected	Observed	Expected	
Step 1	1	15	15,656	3	2,344	18
	2	15	14,428	3	3,572	18
	3	14	12,983	4	5,017	18
	4	13	11,368	5	6,632	18
	5	7	9,997	11	8,003	18
	6	10	8,160	8	9,840	18
	7	5	5,893	13	12,107	18
	8	3	4,177	15	13,823	18
	9	3	2,518	15	15,482	18
	10	1	,820	17	17,180	18

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Grupo		Percentage Correct
		Controles	Melasma	
Step 1	Grupo Controles	64	22	74,4
	Melasma	27	67	71,3
	Overall Percentage			72,8

a. The cut value is ,500

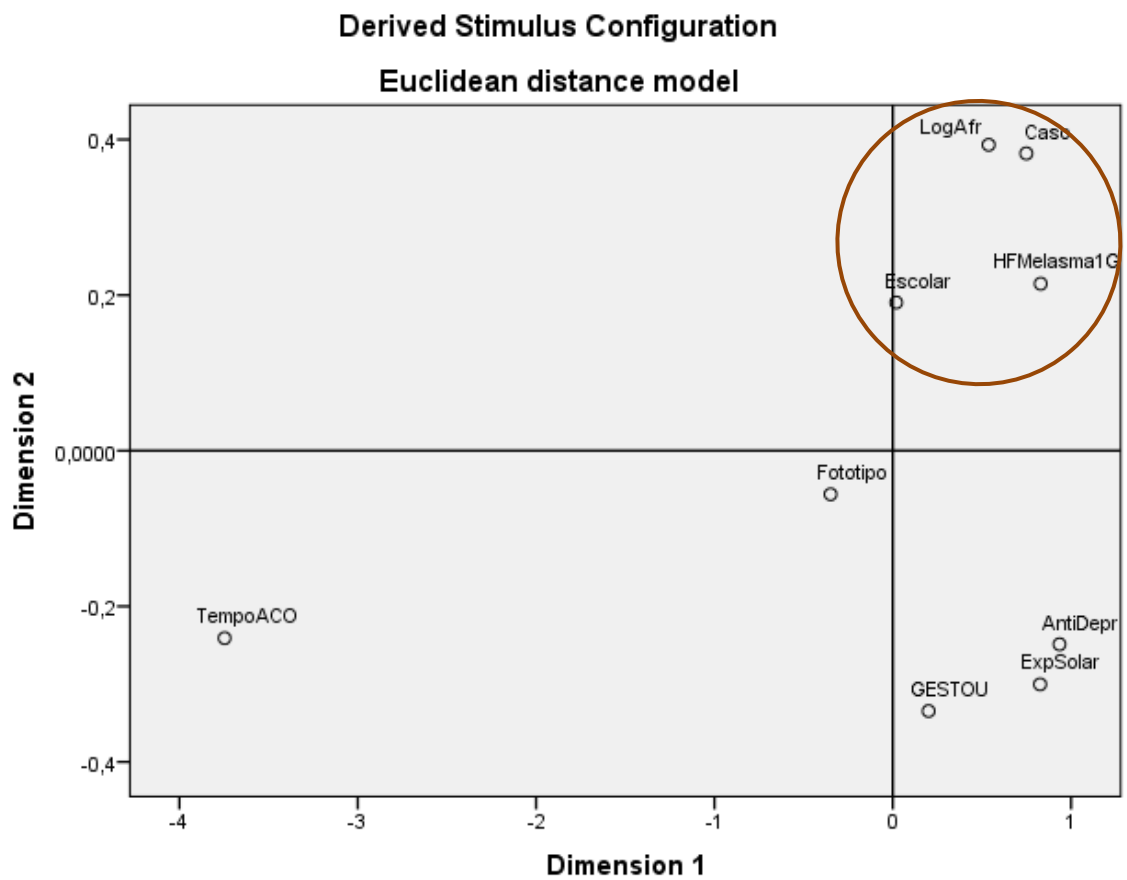
Variables in the Equation						
	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
					Lower	Upper
Step 1 ^a	Idade	2,760	1	,097	,961	,917 1,007
	Fototipo	6,486	3	,090		
	Fototipo(1)	1,627	1	,202	1,878	,713 4,946
	Fototipo(2)	3,273	1	,070	2,607	,923 7,360
	Fototipo(3)	,446	1	,504	,598	,132 2,703
	HFMelasma1G(1)	6,585	1	,010	2,801	1,275 6,150
	Escolar	7,239	2	,027		
	Escolar(1)	6,781	1	,009	4,959	1,486 16,551
	Escolar(2)	,265	1	,607	1,240	,547 2,815
	ExpSolar(1)	,162	1	,687	1,191	,508 2,795
	TempoACO	1,278	1	,258	1,030	,979 1,083
	GESTOU(1)	2,593	1	,107	2,174	,845 5,595
	AntiDepr(1)	,310	1	,578	2,219	,134 36,672
	CEMAfr	6,800	1	,009	1,049	1,012 1,088
	AntiDepr(1) by HFMelasma1G(1)	5,617	1	,018	13,080	1,560 109,651
	AntiDepr(1) by GESTOU(1)	1,996	1	,158	,114	,006 2,317
	Constant	1,256	1	,262	,362	

Casewise List^a

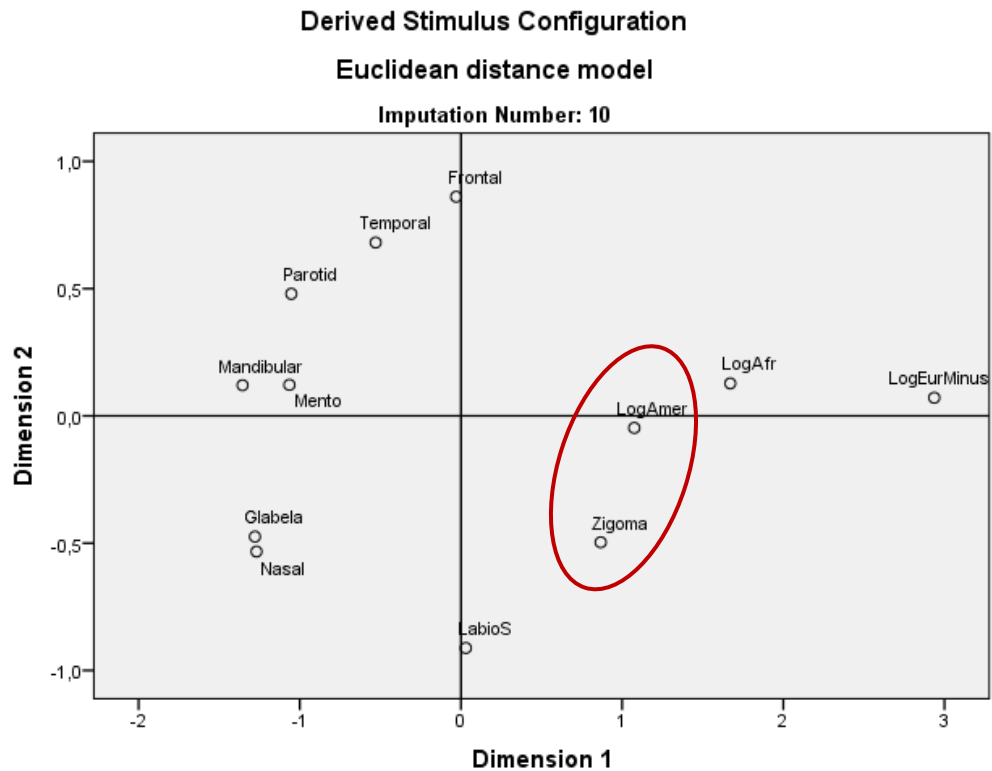
--

a. The casewise plot is not produced because no outliers were found.

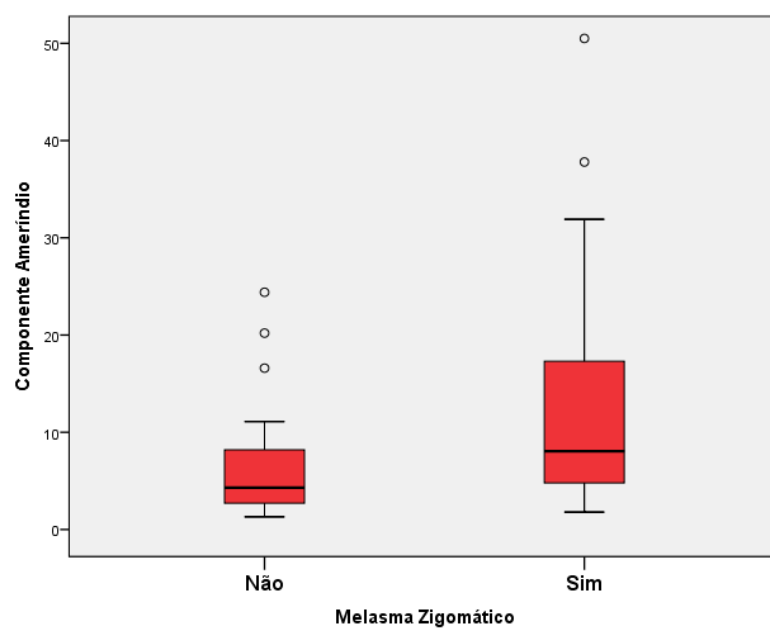
Apêndice 9. Análise de sensibilidade. Escalonamento multidimensional demonstrando as proximidades (associações) entre as variáveis do modelo logístico final (N=238).



Dados brutos, distância euclidiana ao quadrado.
RSQ = 0,98; Stress = 0,10.

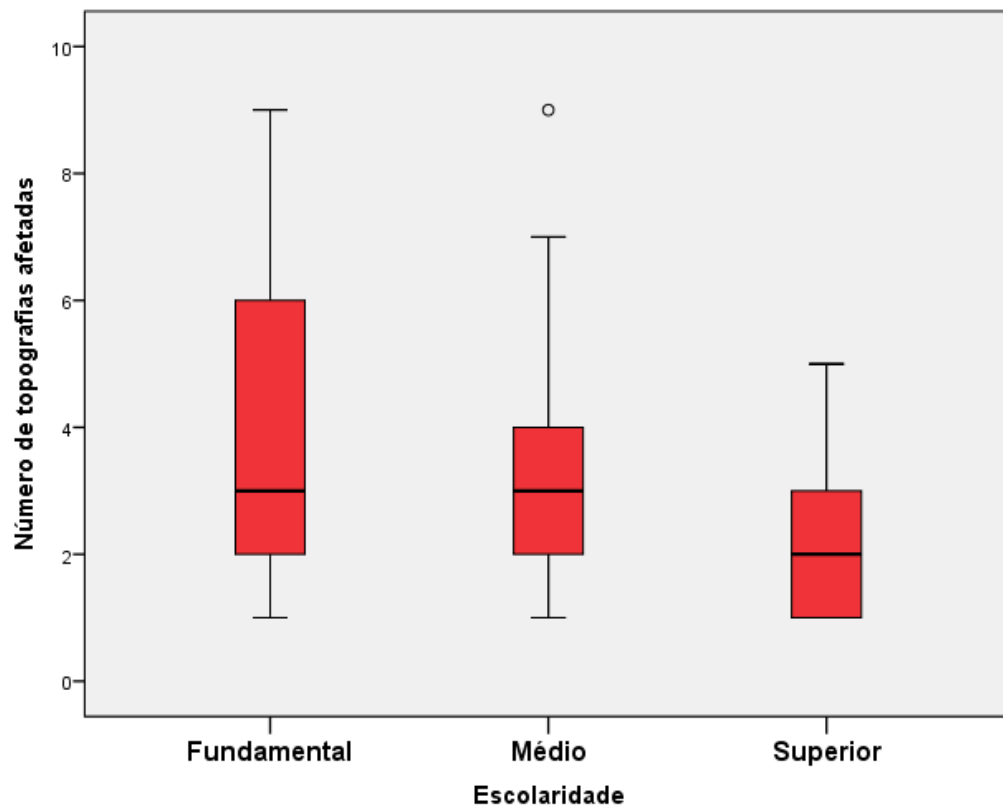
Apêndice 10. Associação da topografia zigomática com o componente ameríndio.

Distribuição do componente ancestral ameríndio de acordo com a topografia zigomática dos melasmas



Teste de Mann-Whitney; $Z = -2,673$; $p < 0,01$

Apêndice 11. Distribuição do número de topografias faciais afetadas entre os casos e a escolaridade.



Teste de Jonckheere-Terpstra; J-T = - 3,36; $p < 0,01$

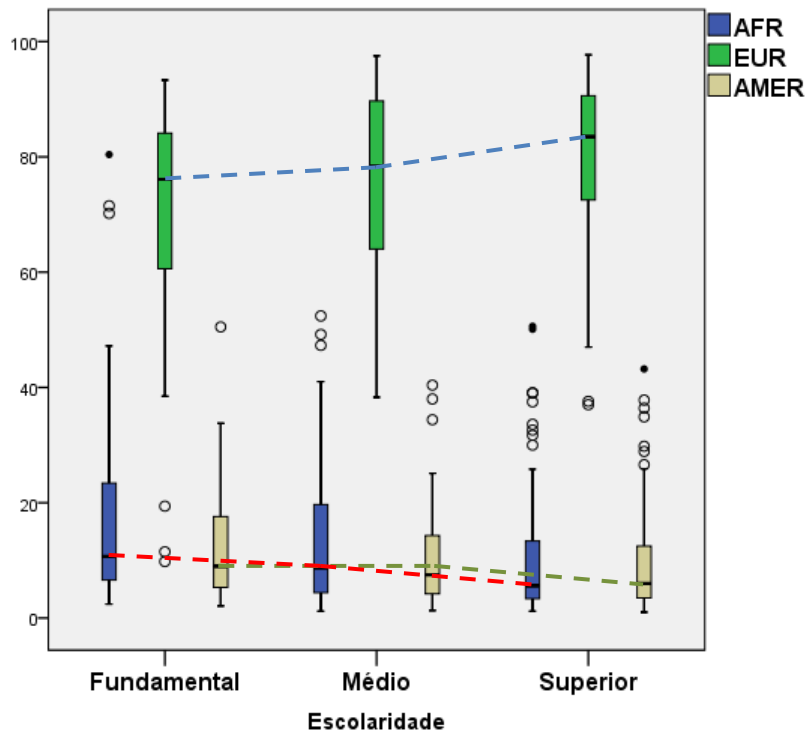
Comparação *post-hoc* (Dunnet T3): Fundamental vs Médio, $p = 0,45$;

Fundamental vs Superior, $p < 0,01$; Médio vs Superior, $p < 0,01$

Distribuição do número de topografias faciais afetadas entre os casos e a escolaridade: mediana (p25-p75).

	Fundamental	Médio	Superior
Mediana	3	3	2
p25	2	2	1
p75	6	4	3

Apêndice 12. Distribuição dos componentes ancestrais em relação à escolaridade.



AMER – Ameríndio; EUR – Europeu; AFR – Africano

Teste MANOVA (*Pillai's trace*) $p < 0,01$ (Componentes em Log_{10})

Comparação *post-hoc* (Bonferroni): $p(\text{AFR}) < 0,01$; $p(\text{EUR}) < 0,01$; $p(\text{AMERIND}) = 0,05$

7. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-UNESP.

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ANCESTRALIDADE EM MULHERES COM MELASMA FACIAL: UM ESTUDO TRANSVERSAL.

Pesquisador: Maria Paula Barbieri D'Elia

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 19900013.4.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Dermatologia e Radioterapia

Patrocinador Principal: SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 430.628

Data da Relatoria: 21/10/2013

Apresentação do Projeto:

RESPOSTA À PENDENCIA.

Objetivo da Pesquisa:

Constante do Parecer 419.781

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constante do Parecer 419.781

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Constante do Parecer 419.781

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram a autorização da UFPA solicitada no parecer 419.781

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação pelo CEP na reunião extraordinária, que acontecerá em 21/10/2013.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 430.628

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO em reunião extraordinária do CEP de 21/10/2013. Ao final da execução do projeto apresentar Relatório Final de Atividades.

BOTUCATU, 21 de Outubro de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO CNS nº 466/12)

Você foi convidada a participar de um projeto de pesquisa chamado "**Avaliação comparativa da ancestralidade em mulheres com melasma facial: em estudo transversal.**", que pretende estudar se a origem familiar pode estar relacionada ao desenvolvimento de determinado tipo de mancha na face denominada melasma.

A pesquisa consta apenas de algumas perguntas sobre características da sua pele, origem de sua família, gestação e alterações hormonais. Depois, pediremos para fazer uma raspagem da face interna da sua bochecha para realizar um exame que determina a origem de sua família: indígena, africana ou europeia, e o quanto de miscigenação houve. Todo o procedimento não deve demorar mais de 10 minutos para ser concluído.

O material coletado será armazenado no laboratório de biologia molecular do Departamento de Patologia e poderá ser utilizado em pesquisas futuras, sempre preservando a sua identidade e seu desejo de participar dos estudos. Este material quando for reutilizado, será formalizado um novo Projeto de Pesquisa, bem como um Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a ser analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e você será reconvocada para nova autorização do uso desse material.

O conhecimento dessas características permite que sejam elaboradas novas hipóteses sobre as causas, fatores desencadeantes e possíveis tratamentos dessa doença da pele.

O procedimento não é doloroso, mas pode gerar um desconforto pela raspagem da sua boca. Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento ou preferência de agendamento médico.

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

Em caso de dúvida entrar em contato com o comitê de ética, fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609.

Uma via desse termo de consentimento deve ser guardada com o sujeito da pesquisa, e outra será arquivada junto ao pesquisador.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome do paciente: _____ Assinatura: _____

Dra. Maria Paula Barbieri D'Elia Data: ____/____/____ Assinatura: _____

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

Pesquisadora: Maria Paula Barbieri D'Elia, Rua Damião Pinheiro Machado, 930, Botucatu. Fone: (14) 3814-2036. E-mail: mpbarbieri@yahoo.com.br

Anexo 3. Painele dos 62 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) de inserção-deleção (INDEL), validados para a população brasileira. Incluindo a localização de cada marcador no genoma reportando os alelos, o tamanho esperado de cada amplicon e a fluorescência escolhida para compor o conjunto *multiplex*.

Num. rs	Marcador	Cromos.	Posição	Alelo1/Alelo2	Amplicon	Primer	Corante
rs2307922	MID1726	1	38178337	[-/caagaactataat]	243-256	F- 5' GTCCAAATGCACCACAATCTT 3' R- 5' TTT GTA CTA CGG CAC ATT AAG AGG 3'	PET
rs2308261	MID2070	1	59104261	[-/ttaca]	305-312	F- 5' TGT TGG GAT TTG AAC TCT TGATTA G 3' R- 5'CAT ATC TCC ATT CTC CCA TAT CAT C 3'	NED
rs2307582	MID1386	1	221067572	[-/aaactattcattttcacct]	327-348	F- 5' ACA AAG AGA ACA GCC TCC AGA C 3' R- 5' TAA TCA ATC CCC AGA CAA CTC C 3'	VIC
rs25574	MID350	2	205324392	[-/tta]	102-105	F- 5' CTT GGA GAT GTA CCA GGA AAA TG 3' R- 5' AAG TGG GTG TTT CCA ATC ATT C 3'	PET
rs2308203	MID2011	2	103711267	[-/ctaga]	192-197	F- 5' TGAGTAGGCCAATAAGAACATCC 3' R- 5' TTA CTT ACG CTT CGG GTT CAT T 3'	PET
rs16653	MID216	2	185153341	[-/tatt]	226-231	F- 5' CTG TAT TTG GTC ATT CAA GCT GTT 3' R- 5' CTG TCC ACT TGG GTC TCA AAA T 3'	NED
rs2308205	MID2013	2	192427899	[-/tgaagattagttattcatcacaatg accttagactac]	280-326	F- 5'CAG CAG ATT CAA GAA TGT CAC C 3' R- 5'ATT CCA TGC ATG TGT AAG CAG A 3'	PET
rs2307828	MID1632	2	74780497	[-/gtggtata]	328-336	F- 5'CCAAAGTGGAGAGAAACAGAGG3' R- 5'GCAACCCTCACTCTAGATCACC3'	6-FAM
rs2307981	M1D1785	3	12001549	[-/ttg]	95-98	F- 5' CGGGTGTGCATTCTACATTCT 3' R- 5' GGA GGA TGA ATA TGG TGG TCT C 3'	NED
rs2307644	MID1448	3	189561118	[-/atac]	162-165	F- 5' GAT CTC CTC TGA TCC TGA TTT TG 3' R- 5' CAT GGA TAA CTC TGT GGA TGG A 3'	6-FAM
rs4183	MID17	3	3131718	[-/taac]	197-201	F- 5'ACT GCA ACC CTC CAA GTA ATG T 3' R- 5' GAT CCC AGA CAC TGA AGA TGA A 3'	NED
rs1611095	MID1013	5	122973840	[-/ccag]	99-103	F- 5'CCTAATGCCTTTTCTGTTCCA3' R- 5'TGTTTAGCTTCCTGGACTGGTT3'	PET
rs1611070	MID988	5	109678924	[-/cttt]	149-153	F- 5' CAC AAT AGC CAT GTT TGC ATC T 3' R- 5' CCT TTC TCC TGA TTC ACC AAA T 3'	PET
rs1610875	MID789	5	9286377	[-/agag]	161-165	F- 5' CAGAGTAGAAATTGGCTTCCTCA 3' R- 5' GAT GCT ATC AGT CTT GCT AAT GGA 3'	NED
rs2307799	MID1603	5	66724153	[-/ttgt]	234-238	F- 5' AAA AGA CTG GAG GTT CCT TTT GA 3' R- 5' GTG CAA ATA AAA CGC AAC AGA A 3'	VIC
rs2067128	MID1039	5	33862409	[-/atggttcattgtgctgtgctg tgaccttgcaaggtgg]	211-251	F- 5' GCG TTT CAT CTC TTT GGG TTA G 3' R- 5' CTG TTC TTA GCA GTG GGC TTT C 3'	VIC

Continuação

Num. rs	Marcador	Crom.	Posição	Alelo1/Alelo2	Amplicon	Primer	DYE
rs1610941	MID856	5	62283289	[-/gaatcttcaatcacaacgaagaaga]	256-282	F- 5' TTA ATT CTT GAG GGC AGA GGA G 3' R- 5' TAT TGT GCT CAT TTT CTG GGT C 3'	6-FAM
rs140762	MID473	6	11581161	[-/aatgtaa]	83-91	F-5' GCA ACA ACC AAG ACA AGG ATT 3' R-5' AAA ATG TTA AGC CTC CCC TGT 3'	6-FAM
rs1160850	MID591	6	22854507	[-/ttaa]	114-118	F- 5'ATT GCC ATC ACT GTA ATC TTG GT 3' R- 5'AAT TAG AGT AGA AAA GCA GCT TCC A 3'	6-FAM
rs140847	MID558	9	12549927	[-/cggt]	311-315	F- 5'TAAGTGAGATAATAAAATGCGCTTGG3' R- 5'GTGGATACCTGTGGAGAGAAGAAA3'	6-FAM
rs2067186	MID1098	10	72466651	[-/aatcaatatt]	340-349	F- 5' TCC TTT CAG GTA TCA GTC CCC 3' R- 5' TGG AGA GAA GTG GGT AGA TTT GA 3'	NED
rs2307976	MID1780	11	35294648	[-/gaa]	104-107	F- 5' AGG AAA CGG CAC TTA TGA CTT C 3' R- 5' CGC AGA TAT TAG CCT GAC CTT C 3'	NED
rs2307666	MID1470	11	62055890	[-/gttac]	133-139	F- 5' AGT CTG ACC CTT CAT AAG CAA GA 3' R- 5' ATC CCA AAC AAC CAC ATA GGA G 3'	NED
rs2308144	MID1952	15	40049495	[-/tcca]	96-100	F- 5' TTT GCT CCC ACA GCA TTA GTC 3' R- 5' AGT AAA CAA ACG GCT GCA AGA 3'	6-FAM
rs2067259	MID1172	16	2410877	[-/ggcct]	113-118	F- 5' CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC 3' R- 5' CAGCTTGCTTGGTCAACTGC 3'	VIC
rs1610864	MID778	16	68144755	[-/aat]	197-200	F- 5' GTG ACA GGC TTT ATA GGC CAA C 3' R- 5' TTT ACC TGC TGT GGA CTT GAT G 3'	VIC
rs2067270	MID1183	16	43065720	[-/tcag]	164-168	F- 5'AATGGACTGTGATTTTGGATTG3' R- 5'ATGAAGTTGACATGTGGGAATG3'	PET
rs16710	MID273	17	5404941	[-/caac]	137-141	F- 5'GGTGTGATCAATTCCAACCTGC 3' R- 5'AAA GGA AAT CAC GTC TAA GTG ACC 3'	6-FAM
rs25549	MID325	17	54492124	[-/aatg]	209-211	F- 5'TTAGGTATACGGCAGAGGATGG 3' R- 5'CATGCACCTCCTTGTTATGT 3'	PET
rs2307587	MID1391	17	17176824	[-/tacatatcaatctataac]	218-238	F- 5'AATTCCCAGGGATAACCACTCT3' R- 5'CCTGGCTCATAATTGGGTTT3'	NED
rs16383	MID93	22	25854689	[-/aga]	146-149	F- 5' TGA CCC CAG TTA CTA ATG AAA ACC 3' R- 5' CAC AGC TTT TTC TCC AGT GTT G 3'	VIC

Continuação

Num. rs	Marcador	Crom.	Posição	Alelo1/Alelo2	Amplicon	Primer	DYE
rs140864	MID575	1	34666090	[-/ttc]	175-179	F- 5' AAC TGG TCA AAA TCT GCT CCA T 3' R- 5' TAC GTG GAC CTA GCA TTC CTC T 3'	NED
rs2307659	MID1463	1	77934148	[-/ttgt]	293-297	F- 5' CAG AAG TAG GCT GAC TGG TGT TT 3' R- 5' CAG AGT ATC TGG GGC TTT TCA C 3'	6FAM
rs1160876	MID625	2	31342236	[-/cat]	115-118	F- 5' TAC GGC TAG GCT ACA AGA CCT C 3' R- 5' CACAAGGAGACAGAACTTCATCA 3'	PET
rs140770	MID481	2	63724924	[-/caggtac]	283-290	F- 5' AGA TTT GAT AGA AAT GCA GGA ACC 3' R- 5' GTA GTT GGG GAA GAG TGC AGA C 3'	NED
rs16343	MID51	4	18100554	[-/tttat]	273-278	F- 5' TTG ATT GGG TGA GCA TTA TTT 3' R- 5' TTT GCA TCT GTA GAC TGG TTG G 3'	VIC
rs2067353	MID1271	5	105719772	[-/atttt]	144-150	F- 5' GTA TTA AGG TTT CCG GCC TCA C 3' R- 5' AAGATGAGAAGCAGGTTTGA 3'	NED
rs2067263	MID1176	5	52479514	[-/aat]	149-152	F- 5' GCT TAC CTA GCA GGG TTG TTG T 3' R- 5' AAATCCCAGTCCAAGGTGATA 3'	VIC
rs2067141	MID1052	5	88239324	[-/acaa]	212-216	F- 5'GGCGTAAAATTAAATACACAGGACA3' R- 5'GGCTGCATCTATAAGACACTTCATT3'	NED
rs1611106	MID1025	5	18803448	[-/gttaa]	260-265	F- 5'CACCGCTTCTTTGTATGGATAGTT3' R- 5'ATGCTTATTGAGGAAGCAGTCATAG3'	PET
rs16635	M1D196	6	100433948	[-/cat]	112-115	F- 5' AAC CAA GTT CTA GCC ATA TGG AAC3' R- 5' AAA GCT TCA GTG AAT TCC AAG G 3'	VIC
rs2308115	MID1923	6	13185905	[-/tga]	134-138	F- 5' CAC TAC TGA GAT GCT TTC ACC AA 3' R- 5' CCT TTC CTG TAC GTG CTT CTT T 3'	6FAM
rs2307912	MID1716	6	84275361	[-/aga]	182-186	F- 5' TTT GTG TGT GTG TGT GTG TGT G 3' R- 5' ACCTCAGCATCACCAGAAGAGT 3'	VIC
rs140783	MID494	6	8388809	[-/cgatgcatct]	227-236	F- 5' AGACACATGGAGGAAAGACCAT 3' R- 5' TGT TAC GGA AAT CAC AAG AAC G 3'	NED
rs1610996	MID913	6	39865711	[-/aaagtgaattca]	331-344	F- 5' CTA GAA TGT CAA GAC CTG GGA TG 3' R- 5' TGG CCT TTG ATT GGA TAT GAG 3'	NED

Continuação

Num. rs	Marcador	Crom.	Posição	Alelo1/Alelo2	Amplicon	Primer	DYE
rs16654	MID217	7	140766058	[-/ata]	171-174	F- 5' AAA GGC AGA TTT AGG GAC CAC 3' R- 5' GGA TGA AGG GGA AAA AGT ATG A 3'	PET
rs1160871	MID619	7	28158757	[-/tctt]	198-201	F- 5' GAC TCT TTT CCT TGA CCC TTC A 3' R- 5'GAG AGG TAG AGG GAG TTT GGG 3'	6FAM
rs140765	MID476	9	19639579	[-/aga]	167-170	F- 5' CAT TGA TGT CTA TTT GCC TTT GAG 3' R- 5' TTC CTA GGG CTG GAG TTA CTG A 3'	6FAM
rs1160910	MID682	9	67940083	[-/aaag]	173-176	F- 5' CTC CAT TCT TTC AGC CAA CTC T 3' R- 5' CAA AGC ACT TCA TGG AAT TAA GG 3'	VIC
rs1160894	MID660	10	17295939	[-/cat]	109-112	F- 5' AAA GGC CAT GCC AAT AAT TTT C 3' R- 5' ATG GCA AGTCAT TCA ATC CTT C 3'	NED
rs140857	MID568	13	74794171	[-/aca]	201-204	F- 5' TTT AGT GTG CCT CCT TCA AAC A 3' R- 5' GGG TGA GTT GTT GAG TGT GAG T 3'	PET
rs2307553	MID1357	14	60159869	[-/tgac]	95-99	F- 5' TTA TAC CTG CAA AGT GGG CAT T 3' R- 5'GTTCCAGCAAACAGAACACAAG 3'	6FAM
rs2307880	MID1684	14	18692312	[-/aggtgg]	157-163	F- 5'GTGATGTTTTTACAAAGCAGGAA 3' R- 5'TCA TCC ATG TCT ATG TCT TCA GC 3'	6FAM
rs16416	MID132	15	3527138	[-/acag]	190-194	F- 5' AAT GAG ATT GCC AGC TTT CCT A 3' R- 5' CCA CCC ACA AAA TTG GAC ATA 3'	NED
rs1610902	MID818	16	2415015	[-/gtctggggagctgttctctacccc]	222-245	F- 5' AGA GCC AGT TAG AGG GAG GAT G 3' R- 5' GAA CGA GAG TGC GAA CCA AAT 3'	6FAM
rs2067271	MID1184	16	68111678	[-/tgtgcagatg]	243-253	F- 5' CGG TTC AGT CTT GAT TGT GCT A 3' R- 5' TCC AAT TCT CTC CTG CAA AAC T 3'	PET
rs25546	MID322	17	12704466	[-/aaat]	117-121	F- 5'AAA ACC TTG TGG TCT GTA ATG AGG 3' R- 5'CAG CCC TGG GTT ATT ATT CTT ATT T 3'	NED
rs16712	MID275	17	65454902	[-/acact]	210-215	F- 5' TCT TTC TGC CAA TGA CTT CTA GC 3' R- 5' ACA AAC TGA CTG ACT TCC ACG A 3'	6FAM
rs2307554	MID1358	5	35502077	[-/agaatgacttcattctg]	235-252	F- 5' AAA AAC ACC CTT TGC TGA AGT C 3' R- 5' ACA GAC GCC AGG AAT TTT CTA T 3'	VIC
rs16432	MID152	20	2192651	[-/cggcagtg]	255-263	F- 5' CTC CCT GCT GAT ACC GTC TAT AA 3' R- 5' GGA GGC AGA AGT CCA GAG ATA C 3'	6FAM

