



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

Giovana Piteri Alcantara

**PADRONIZAÇÃO DE CULTURA ORGANOIDE CUTÂNEA E AVALIAÇÃO DA
RESPOSTA MELANOGÊNICA NO MELASMA AO UVB, UVA E LUZ VISÍVEL**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU

**PADRONIZAÇÃO DE CULTURA ORGANOIDE CUTÂNEA E AVALIAÇÃO DA
RESPOSTA MELANOGÊNICA NO MELASMA AO UVB, UVA E LUZ VISÍVEL**

Mestranda: Giovana Piteri Alcantara

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

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

Botucatu

2019

A347p

Alcantara, Giovana Piteri

Padronização de cultura organoide cutânea e avaliação da resposta melanogênica no melasma ao UVB, UVA e luz visível.

/ Giovana Piteri Alcantara. -- Botucatu, 2019

71 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Helio Amante Miot

1. Melasma. 2. Cultura organoide. 3. Fotobiologia. 4. Ultravioleta. 5. Luz visível. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	8
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	9
AGRADECIMENTOS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS	12
PREFÁCIO	13
1. RESUMO.....	14
2. REVISÃO LITERATURA	16
3. OBJETIVOS.....	32
4. PRIMEIRO ARTIGO	33
5. SEGUNDO ARTIGO	45
6. CONCLUSÕES	60
7. ANEXOS	61

DEDICATÓRIA

A minha família

Meu amado companheiro de vida, Fausto, por estar presente em todos os momentos, trazendo leveza e alegria a esta jornada. Ele que conhece tão bem todos os passos para minha especialização em Dermatologia; que me auxiliou na decisão de ingressar na Pós-Graduação e fez com que o caminho fosse muito tranquilo.

Meu grande incentivador e amigo, agradeço imensamente ao Universo por você escolher todos os dias estar comigo.

Aos meus queridos pais Ivan e Sandra, não há palavras para descrever a imensa gratidão por tudo que vocês têm feito por mim. A dedicação e, muitas vezes, abdicação de vocês fez com que o hoje fosse possível.

Reconheço em mim a paciência e determinação de meu pai e a garra e força da minha mãe. Hoje, mais uma etapa concretizada e a certeza que levo de vocês as melhores coisas. Obrigada, obrigada, obrigada. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Amanda e Allan, gostaria de registrar o quanto os amo e desejo que vocês alcem vãos e sejam felizes com as suas próprias escolhas. Vocês merecem toda a felicidade do mundo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus

Por me permitir viver esta experiência engrandecedora de aprimoramento pessoal e profissional e, por colocar as pessoas certas no meu caminho sempre.

Ao meu orientador, Dr Hélio Miot

Um grande exemplo de dermatologista e pesquisador, que com paciência me fez crescer muito mais do que eu imaginava nesta jornada. Com certeza, caminhamos juntos na construção deste trabalho. Hoje, termino não com a sensação de alívio, mas com a tranquilidade do dever bem cumprido. Graças aos seus ensinamentos e ajuda, levo uma parte do amor pela pesquisa.

Às queridas Thainá e Ana Cláudia

Vocês foram essenciais da idealização à conclusão do trabalho. Obrigada pela ajuda irrestrita durante o processo, sejam muito felizes minhas grandes parceiras. Vocês merecem todas as conquistas do mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus queridos pacientes.

A confiança que depositaram em toda nossa equipe em prol do nosso trabalho e, mais que isso, por acreditar que algo maior possa ser construído para toda a sociedade.

A todos os meus amigos de residência e de vida.

Que estiveram presentes em todas as etapas, direta ou indiretamente, compartilhando todos os momentos de dificuldade e alegrias no bloco 1, enfermaria e na vida.

A todo o Departamento de Dermatologia.

Docentes, médicos contratados, médicos colaboradores, biólogas, fotógrafa, equipe de enfermagem, funcionários com quem tanto aprendi nestes anos. Meu eterno agradecimento.

A minha banca de qualificação, Dra. Luciana Abbade e Dra. Maria Regina Cavariani.

Duas pessoas as quais admiro profundamente pelas mulheres e profissionais que são, obrigada pela imensa contribuição na lapidação deste trabalho.

A minha banca de defesa, Dras. Ediléia, Mayra e Regina e Dr. Juliano.

Dermatologistas ímpares que com olhar crítico e competência engrandeceram ainda mais minha tese. Além disso, trouxeram maravilhosas considerações pessoais com grande valor para minha vida.

Às enfermeiras Cláudia, Márcia e Nádia.

Que tanto me ajudaram durante a coleta dos materiais e todos os outros dias com a alegria e os cafés deliciosos.

À Denise, do Laboratório da UNIPEX, e Marcos, do Laboratório da Patologia UNESP.

Pela dedicação e companheirismo na confecção das lâminas para o trabalho.

A FUNADERM.

Pelo financiamento e fomento à pesquisa sem o qual o trabalho não seria possível.

Trabalho desenvolvido no ambulatório de Dermatologia

HC-UNESP

Projeto financiado pelo Fundo de Apoio a Dermatologia

(FUNADERM)

Bolsa de estudos para aluna de iniciação científica (Thainá Olivatti)

(PIBIC-CNPq)

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

a.c. - antes de Cristo
 CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
 CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
 cm - centímetro
 CNS-MS - Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde
 CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
 DLQI - *Dermatology Life Quality Index* - Índice de qualidade de vida em Dermatologia
 DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium
 FM - Fontana Masson
 FMB-Unesp - Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
 FS - filtro solar
 FUNADERM - Fundo de Apoio à Dermatologia
 GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
 h - hora
 HC-FMB - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
 HC-Unesp - Hospital das Clínicas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
 H&E - hematoxilina e eosina
 IL17 - interleucina 17
 iNOS - óxido nítrico sintase induzido
 J - Joule
 J/cm² - Joule/centímetro quadrado
 kg/m² - quilograma/metro quadrado
 LV - luz visível
 MC1R - receptor de melanocortina do tipo 1
 MELASQoL - *Melasma Quality of Life Scale* - Escala de qualidade de vida no melasma
 MELASQoL-PB - *Melasma Quality of Life Scale* - Escala de qualidade de vida no melasma (português brasileiro)
 MEPAREM - Mestrado Profissional associado à Residência Médica
 mg - miligrama
 mJ - miliJoule
 mJ/cm² - miliJoule/centímetro quadrado
 mm - milímetro
 mMASI - *Melasma Area and Severity Index* – Índice de gravidade e área do melasma
 mW/cm² - miliWatts/centímetro quadrado
 n - número
 nm - nanômetro
 p - significância do teste estatístico
 PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
 rt-PCR - reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
 SBD - Sociedade Brasileira de Dermatologia
 SP - São Paulo
 TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido
 UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
 UV - ultravioleta
 UVA - ultravioleta A
 UVB - ultravioleta B
 W - Watts
 W/cm² - Watts/centímetro quadrado
 αMSH - hormônio estimulador de melanócitos tipo alfa

PREFÁCIO

As dermatoses compreendem um grande número de doenças dentro da medicina e o alto impacto na vida dos pacientes me impulsiona a compreendê-las e, assim, auxiliá-los no entendimento e também, na possível cura. No intercurso desta especialidade tão rica, deparei-me com doenças raras como as ictioses; potencialmente incapacitantes como hanseníase; graves como o melanoma; e habituais ao consultório como acne, melasma. Todas devem ser igualmente valorizadas.

A pele é nosso espelho para o mundo, revelamos nela muito do que nos preenche. As dermatoses estão intimamente relacionadas ao nosso estilo de vida, aspectos psicológicos e todos os cuidados com a saúde. A valorização das doenças dermatológicas, da mais simples para a mais complexa, advém da preocupação com o bem-estar dos indivíduos e da beleza da multiplicidade.

O estudo de modelos fisiopatológicos das dermatoses humanas ainda é um desafio. A pele é um órgão complexo que não é facilmente reprodutível, aliar bioética a um modelo adequado permanece em desenvolvimento. Mostraremos a complexidade do tema e a nossa busca, nas primeiras páginas do texto. Os modelos de cultura organoide cutânea revelam um potencial para estudo das doenças dermatológicas e será explorado na nossa pesquisa da indução de melanogênese.

A pele com suas variadas funções, depende de um modelo que mantenha as diversas interações entre o meio externo e interno. Diversas doenças dermatológicas estão implicadas nas alterações pigmentares e, exploramos mais especificamente uma das mais comuns, o melasma.

O melasma, apesar de restrito à pele, impacta negativamente a vida dos pacientes. A localização preferencial da face gera sofrimento e recolhimento social dos indivíduos. Dito isso, a escolha do tema é de grande relevância para a sociedade.

Detalhamos então, na revisão de literatura, o potencial das culturas organoide cutâneas para estudo da melanogênese; toda a história e os pontos a serem elucidados no melasma além das perspectivas que nossos resultados alcançam.

Nosso trabalho, elaborado em duas etapas, gerou dois artigos científicos. No primeiro, um modelo de cultura organoide primária cutânea, de baixo custo, poderá ser reproduzido para geração de conhecimento no estudo com a pele. O primeiro artigo está aprovado para publicação nos Anais Brasileiro de Dermatologia. No segundo, utilizando este modelo de cultura padronizado, avaliamos os diferentes tipos de radiação (UVB, UVA e luz visível) na pele com melasma e normal adjacente e revelamos os resultados e aplicabilidade prática da nossa pesquisa.

A limitação terapêutica do melasma motivou-nos a explorar a interação entre a pele e o meio externo. Como o estudo da irradiação da pele com melasma seria antiético, optamos pelo desenvolvimento de um modelo que possa responder questões ligadas ao estudo de uma dermatose altamente frequente na nossa população e transcender todo o aprendizado para a prática, mostra a relevância do trabalho.

1. RESUMO

FUNDAMENTOS: Melasma é hipermelanose crônica, focal, adquirida decorrente de patogênese não totalmente compreendida, resultado da alteração funcional e arquitetural dos melanócitos. A predisposição genética, aspectos hormonais e exposição à radiação solar são os elementos mais associados ao desenvolvimento da doença e essenciais para entendimento da fisiopatologia. É bem estabelecida a relação entre a exposição à radiação solar e a piora do quadro, entretanto, o efeito independente do UVB, UVA, assim como a atuação da luz visível (LV) são pouco estudados.

OBJETIVOS: Padronização de um modelo de cultura organoide cutâneo primário para estudo da melanogênese da pele com melasma e pele normal adjacente, à irradiação com diferentes comprimentos de onda (UVB, UVA, LV).

MÉTODOS: Etapa 1: Amostras de pele da região retroauricular (*punch* 3mm), de 10 voluntários foram seccionados longitudinalmente, e cultivados em meio DMEM segundo protocolo estabelecido por Ayres, para padronização de viabilidade e dosimetria das radiações induzindo melanogênese. Um dos fragmentos foi irradiado e o outro mantido ao abrigo da luz por 72h. Foram avaliados aspectos morfológicos e arquitetais da histologia (H&E e Fontana-Masson) e por rt-PCR para comparação da expressão quantitativa de gene constitucional (GAPDH) entre as peles recém-coletadas e as cultivadas. Foram padronizadas as doses de radiação e tempo de cultura que promovessem viabilidade da amostra e aumento de 10% na intensidade de pigmentação da camada basal.

Etapa 2: Amostras de pele facial com melasma e normal adjacente (distância menor que 2cm), de 22 voluntários foram acondicionadas em meio de cultura DMEM: um fragmento ao abrigo da luz e a outra exposta às radiações (UVB, UVA ou LV), segundo a padronização prévia. A pigmentação melânica induzida pelas radiações foi avaliada, na camada basal, pela coloração de Fontana-Masson. Os valores das intensidades de pigmentação melânica das amostras foram comparados entre os grupos (UVB x UVA x LV), entre os procedimentos (irradiado x não-irradiado) e entre as topografias (melasma x normal adjacente) por modelo linear generalizado de efeitos mistos.

RESULTADOS: No processo de padronização, as doses de UVB, UVA e LV (luz azul) indutoras de melanogênese diferencial foram: 166mJ/cm², 1,524J/cm² e 40J/cm². Houve manutenção arquitetural e a expressão de GAPDH não diferiu entre a amostra de pele recém-coletada e a cultivada por 72h. Na fase de comparação, houve melanogênese no melasma e na pele normal adjacente após todas as irradiações ($p<0,01$), sem diferença entre as topografias ($p=0.66$). Após ajuste para o fototipo, houve aumento na granulação da melanina somente após a irradiação com UVA e apenas na pele com melasma ($p<0,01$). Entretanto, a maior proeminência dos dendritos ocorreu apenas na pele com melasma para irradiação com UVB e para LV ($p<0,01$), sem diferença entre UVB e LV.

LIMITAÇÕES: Estudo em cultura de pele, dissociada da regulação hormonal, neural e vasomotora do organismo, e avaliação do efeito das radiações de forma independente.

CONCLUSÃO: Padronizou-se cultura organoide primária de pele, com sobrevivência de 72h, manutenção das propriedades melanogênicas e resposta às diferentes radiações. Explorou-se o papel melanogênico de UVB, UVA e LV no melasma comparada à pele normal adjacente, fundamental no desenvolvimento de novas terapêuticas e a otimização da fotoproteção na doença. Este modelo pode fundamentar estudos em fotobiologia, fotoproteção e regulação da melanogênese.

Palavras-chave: Fotobiologia, Melasma, Cultura organoide, Ultravioleta, Luz visível.

ABSTRACT

FUNDAMENTALS: *Melasma is chronic hypermelanosis, focal, acquired due to pathogenesis not fully understood, resulting from the functional and architectural alteration of melanocytes. Genetic predisposition, hormonal aspects and exposure to solar radiation are the elements most associated with the development of the disease and essential for understanding the pathophysiology. The relationship between exposure to solar radiation and worsening of the condition is well established, however, the independent effect of UVB, UVA, as well as the action of visible light (VL) are poorly studied.*

OBJECTIVES: *Standardization of a primary cutaneous organoid culture model to study melanogenesis of skin with melasma and adjacent normal skin to irradiation with different wavelengths (UVB, UVA, VL).*

METHODS: *Step 1: Skin samples from the retroauricular region (punch 3mm) from 10 volunteers were longitudinally sectioned and cultured in DMEM medium according to the protocol established by Ayres, for viability standardization and radiation dosimetry inducing melanogenesis. One of the fragments was irradiated and the other kept in the dark for 72h. Morphological and architectural aspects of histology (H&E and Fontana-Masson) and rt-PCR were evaluated for comparison of quantitative constitutional gene expression (GAPDH) between newly collected and cultured skins. Radiation doses and culture time that promoted sample viability and a 10% increase in basal layer pigmentation intensity were standardized.*

Step 2: Samples of melasma and adjacent normal facial skin (distance less than 2cm) from 22 volunteers were placed in DMEM culture medium, one fragment protected from light and the other exposed to radiation (UVB, UVA or VL), according to previous standardization. Radiation-induced melanic pigmentation was evaluated in the basal layer by Fontana-Masson staining. The values of the melanin pigmentation intensities of the samples were compared among the groups (UVB x UVA x VL), between the procedures (irradiated x non-irradiated) and between the topographies (melasma x adjacent normal) by generalized linear mixed effects model.

RESULTS: *In the standardization process, the doses of UVB, UVA and VL (blue light) inducing differential melanogenesis were: 166mJ / cm², 1,524J / cm² and 40J / cm². There was architectural preservation, and GAPDH expression did not differ between the newly collected skin sample and the one cultivated for 72h. In the comparison phase, there was melanogenesis in the melasma and adjacent normal skin after all irradiations ($p < 0.01$), with no difference between topographies ($p = 0.66$). After phototype adjustment, melanin granulation increased only after UVA irradiation and only in melasma skin ($p < 0.01$). However, the highest prominence of dendrites occurred only in skin with melasma for UVB and VL irradiation ($p < 0.01$), with no difference between UVB and VL.*

LIMITATIONS: *Study in skin culture, dissociated from the hormonal, neural and vasomotor regulation of the body, and evaluation of the effect of radiation independently.*

CONCLUSION: *Primary organoid skin culture was standardized, with 72h survival, maintenance of melanogenic properties and response to different radiation. It was explored the melanogenic role of UVB, UVA and VL in melasma compared to adjacent normal skin, fundamental in the development of new therapies and the optimization of photoprotection in the disease. This model can substantiate studies in photobiology, photoprotection and regulation of melanogenesis.*

Keywords: *Photobiology, Melasma, Organoid Culture, Ultraviolet, Visible Light.*

2. REVISÃO LITERATURA

2.1 Modelos de cultura de pele

Culturas celulares humanas primárias (removidas diretamente dos pacientes) ou de linhagens comerciais (p.ex. HaCaT) são utilizadas em pesquisa fisiopatológica, farmacológica ou de resposta a estímulos específicos. Isso se deve à relativa disponibilidade de tecido e a facilidade dos cultivos em meios adequados por mais de sete dias.¹

Apesar da homologia com os tecidos humanos, as culturas de linhagens celulares não contemplam a interação entre os diferentes tipos celulares que interagem na pele (p.ex. unidade epidermo-melânica). Sistemas comerciais de culturas celulares múltiplas (p.ex. pele 3D: queratinócitos, melanócitos e fibroblastos) são propagadas como uma solução para perceber a interação entre as células da pele, como uma estrutura mais realística do tecido. Entretanto, as linhagens são usualmente de doadores diferentes, com padrões de replicação algo diverso do que se encontra no tecido, também, não apresentam endotélio, células dendríticas, células de Merkel que, mesmo sendo pouco numerosas no tecido, podem oferecer alguma interação relevante, dependendo do fenômeno estudado^{2,3}

As culturas organoides primárias são cultivos teciduais que mantêm as características arquiteturais e as principais relações entre os diferentes tipos celulares, além da matriz extracelular. Apresentam a vantagem adicional de poderem ser amostrados a partir da pele normal e da pele com doença do mesmo hospedeiro, favorecendo a comparação entre os locais.¹

Culturas organoides, porém, são mantidas fora da interação com o organismo, sem estímulos térmicos, neurológicos, hormonais, imunitários e sofrem hipóxia, o que penitencia suas propriedades teciduais em função do tempo. Há ampla literatura que discute a viabilidade em meios líquidos, quanto à temperatura e tempo de cultivo. Esses aspectos serão discutidos posteriormente.

2.2 Melasma

O melasma é hiperpigmentação cutânea crônica adquirida frequente, que afeta milhões de indivíduos no mundo, na maioria, mulheres adultas.^{4,5} É caracterizado, clinicamente, por máculas hipercrômicas, comumente simétricas, de coloração castanho-acinzentada a enegrecida, com limites irregulares e precisos nas áreas fotoexpostas, como a face e colo. O acometimento

facial predomina e relaciona-se diretamente com a diminuição da qualidade de vida dos pacientes afetados.⁶

Os primeiros registros da doença na literatura científica datam do período Hipocrático (470-360 a.c), em que o termo estava atrelado a diferentes pigmentações ocorridas após fotoexposição.⁷ Apesar do antigo conhecimento da doença, questionamentos permanecem sem elucidação e fomentam numerosas pesquisas na comunidade dermatológica.

A palavra melasma tem origem grega “melas” e significa negro, assim como o termo cloasma, também derivado do grego “*cloazein*”, que significa esverdeado. Atualmente, o primeiro termo é o ideal para referência à doença dada à maior semelhança com a apresentação clínica.⁸

O melasma acomete, principalmente, mulheres em idade fértil com diminuição progressiva da prevalência a partir da menopausa.⁵ Existem poucos relatos na literatura de acometimento na infância (crianças andinas) e, casos em homens são menos comuns e menos estudados.⁹⁻¹¹

DIAGNÓSTICO

Clinicamente, melasma caracteriza-se como máculas hiperocrômicas acinzentadas a acastanhadas, em sua maioria, simétricas com limites irregulares e precisos na face, tronco e membros superiores. As lesões são assintomáticas, recidivantes e, não raro, refratárias aos tratamentos. Dessa forma, classificações foram propostas para otimizar os estudos e a resposta terapêutica.⁶

A face é o local mais acometido e a hiperpigmentação pode ocorrer em todas as subunidades faciais. Muitos autores dividem-na de acordo com a localização: centro-facial, malar e mandibular, ou a combinação dos padrões.¹² No entanto, outros autores, preferem uma classificação objetiva (Figura 1): central, periférico, combinado e extra-facial.¹¹ Tamega e colaboradores demonstraram ser o padrão combinado o mais comum, seguido do centro-facial.¹¹

O acometimento extrafacial: tronco, membros superiores, e região cervical ocorre, na maioria, nas pacientes pós menopausa (14,2%) em contraponto com pacientes na idade fértil (3,5%).¹³

Dermatologistas treinados facilmente fazem o diagnóstico baseado no exame clínico, no entanto, diferenciais devem ser levantados em casos atípicos, como: efélides, melanose solar, hiperpigmentação pós-inflamatória, queratose seborreica plana, líquen plano pigmentoso, nevo de Ota, *nevus spillus*, ocronose exógena, lentigo solar, manchas café-com-leite, hiperpigmentação exógena, poiquilodermia de Civate, eritromelanose folicular facial; para a adequada condução do caso.¹⁴

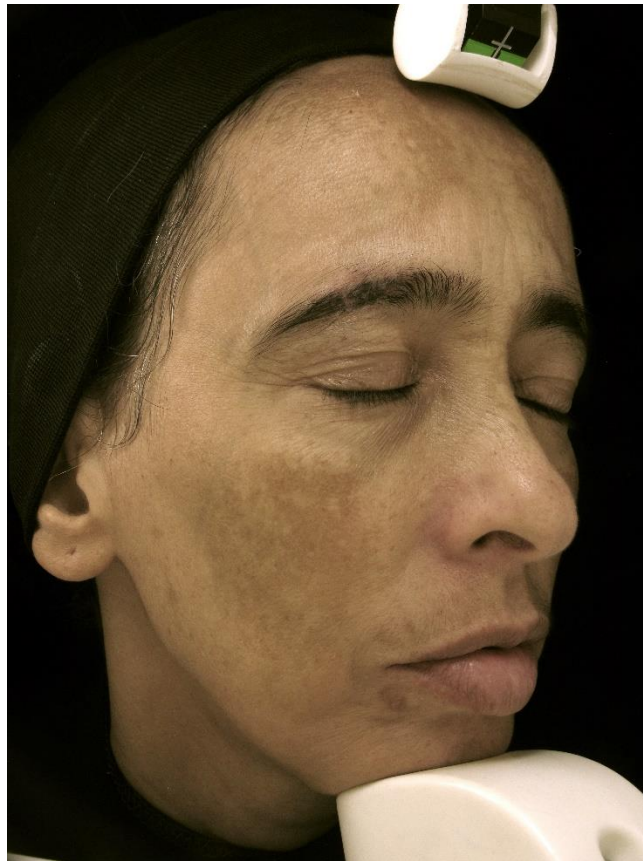


Figura 1. Foto clínica realizada com sistema Visia© de paciente com melasma facial acometendo região frontal, zigomática, bucal, nasal, supralabial e mento (arquivo do pesquisador).

Para auxílio diagnóstico, a lâmpada de Wood (340-400nm luz UV) pode ser utilizada. Alguns estudos associavam os padrões observados com a aplicação da lâmpada de Wood com a profundidade do pigmento (grânulos de melanossomas) e dividiam a doença em quatro tipos: epidérmico, dérmico, misto e inaparente.¹⁵ No entanto, a pouca correlação histológica colocou-a em desuso. Atualmente, é empregada para revelar os limites lesionais e prever a resposta aos tratamentos. Deve ser utilizada anteriormente à realização de luz intensa pulsada e procedimentos ablativos da face, para revelar lesões subclínicas e, eventualmente, contraindicar o procedimento.¹⁶

A análise histopatológica em um estudo com 56 pacientes coreanos observou diferentes padrões entre a pele com melasma e pele não acometida. Em 52 de 56 (93%) das amostras a pele com melasma apresentava moderada a intensa elastose solar, enquanto 39 de 56 (70%) da pele não acometida apresentavam leve a moderada elastose solar, revelando maior comprometimento da pele com a doença. Na pele com melasma houve maior elastose solar, maior

volume dos melanócitos; na quantidade de melanossomas e na sua distribuição. Em relação à presença de melanófagos dérmicos, apenas 7% apresentaram maior quantidade de melanina dérmica no melasma.¹⁰

Outro fenômeno descrito mais frequentemente no melasma que na pele normal adjacente é a projeção dérmica de melanócitos da camada basal, o que se chamou de melanócitos em pêndulo. A função do melanócito em pêndulo na pigmentação ou na manutenção da discromia no melasma está em investigação. As figuras 2 e 3 demonstram as principais alterações histopatológicas do melasma.

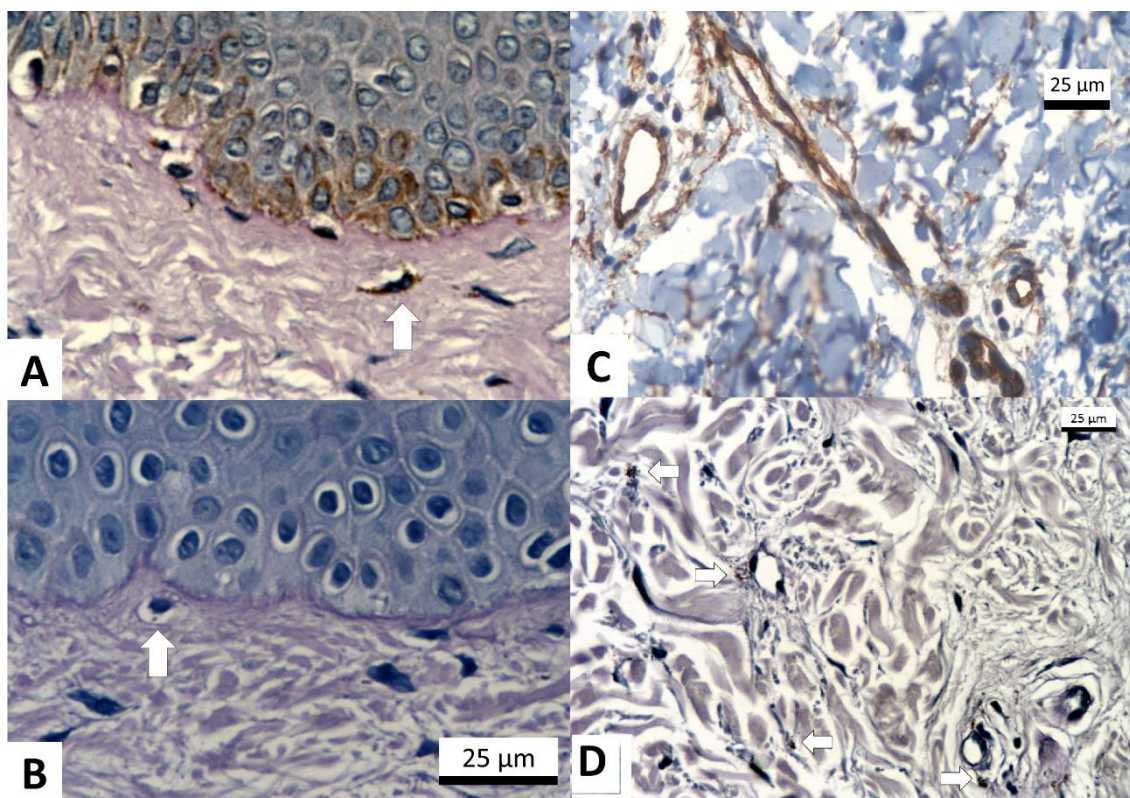


Figura 2. A e B. Melanócitos em pêndulo; C. Proliferação vascular (CD34+) na derme superficial; D. Mastócitos perivasculares na derme superficial (Azul de toluidina) (Arquivo do pesquisador).

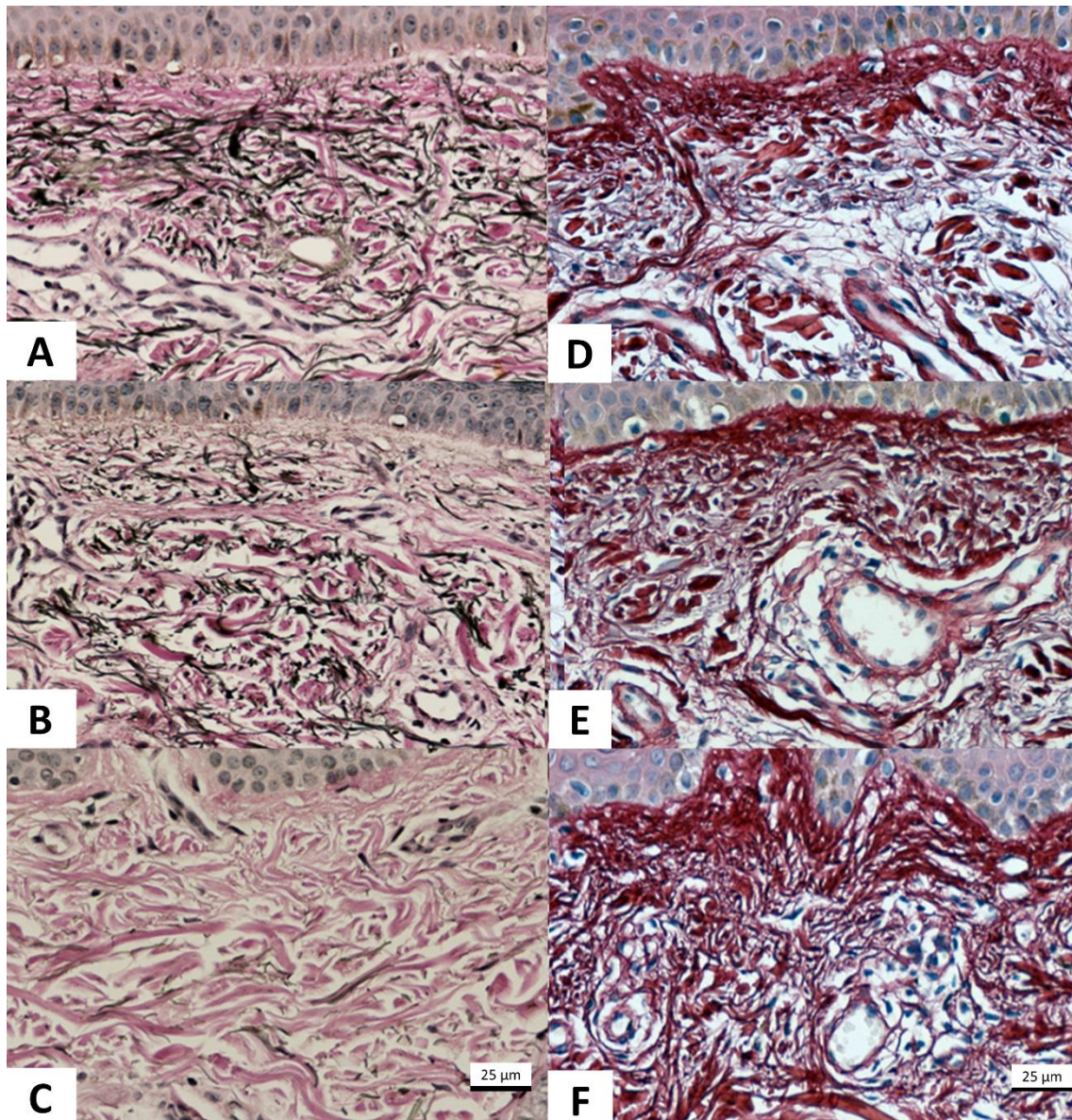


Figura 3. Verhoeff: Acúmulo de material elastótico mais proeminente na derme superficial do melasma (A), que na pele normal adjacente (B) e retroauricular (C). *Picrossirius red*: Fragmentação progressiva do colágeno na derme superficial do melasma (D), pele adjacente (E) e retroauricular (F).

Na dermatoscopia (Figura 4), técnica não invasiva e rotineira ao dermatologista, as seguintes características apresentam-se: pseudorede reticular, pigmentação marrom claro a escuro com preservação perifolicular, pontos ou glóbulos cor marrom, aumento de vasos e telangiectasias.¹⁴

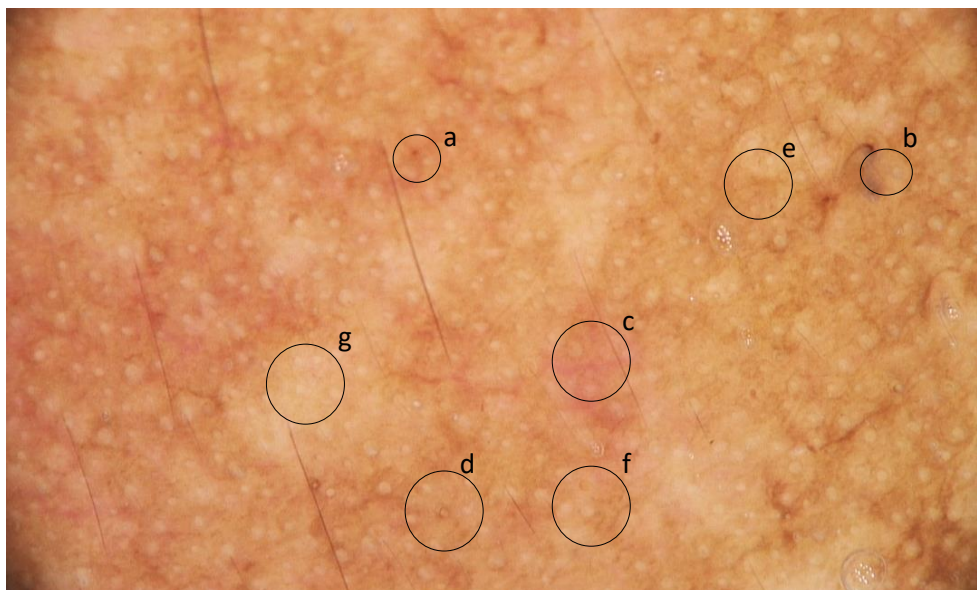


Figura 4. Dermatoscopia (aparelho Heine delta 20T, aumento de 10x) do melasma evidenciando pontos marrons (a), ponto acinzentado intrafolicular (b), áreas vermelho-claras homogêneas (c), telangiectasias (d), pigmentação marrom-acinzentada perifolicular (e), granulosidade azul acinzentada perifolicular (f), hipopigmentação perifolicular (g).

A microscopia confocal é técnica inovadora que permite a visualização em tempo real da pele e resultados semelhantes à histopatologia. Diferentes alvos são observados e, a melanina, é um dos principais, facilitando o estudo da doença pela técnica. Em estudo de Costa e colaboradores melanócitos ativados foram visualizados na parte superior das camadas epidérmicas, além de padrão em “favo de mel” na pele com melasma.¹⁷

EPIDEMIOLOGIA

O conhecimento sobre o perfil das doenças dermatológicas em uma determinada região é indispensável para a adoção de estratégias na área da saúde. Em 2018, um estudo da Sociedade Brasileira de Dermatologia levantou o perfil nosológico das doenças dermatológicas e, entre 9629 atendimentos, melasma alcançou o sétimo lugar, atrás de dermatoses como: acne, fotoenvelhecimento, câncer de pele não melanoma, queratose actínica, micoses superficiais e psoríase. O total de 3,7% das consultas de melasma realizadas no período mostra a relevância do tema.¹⁸

No mesmo estudo de 2018, melasma apareceu como segunda queixa das pacientes entre 25-59 anos, com 6,6% do total, corroborando a faixa etária de comprometimento da doença nos pacientes.¹⁸

A exata incidência da doença é desconhecida por fatores diversos: baixo número de casos na população estudada, desinteresse no levantamento de dados, dificuldade para análise de populações miscigenadas, migrações e heterogeneidade dos indivíduos acometidos.¹⁹

A doença afeta, preferencialmente, mulheres no período fértil entre 30-55 anos e permanece ativa em torno de 10 anos.¹³ Em geral, homens perfazem 10%, chegando a 25% na população indiana.¹⁹ No Brasil, em 2013, em um estudo envolvendo 515 pacientes na Universidade no campus de Botucatu, São Paulo, afetava 34% das mulheres e 6% dos homens.²⁰

A composição étnica é variada, mas predomina nos asiáticos (japoneses, coreanos, chineses), indianos, paquistaneses, africanos, hispânicos-americanos e brasileiros.⁴ Em estudo europeu com pacientes latinos, reforçou-se a tendência de outros estudos, em que a doença acomete mais esta faixa da população.²¹

Os fototipos III-V da escala de Fitzpatrick são os mais atingidos em estudos mundiais, no entanto, um estudo brasileiro realizado na Universidade do Rio Grande do Sul, revelou uma taxa maior de acometimento nos fototipos III e IV, perfazendo um total de 56%.¹³ Os pacientes habitantes dos meridianos são afetados com maior gravidade, provavelmente pela exposição intensa à radiação.¹¹

FATORES DE RISCO

Os agentes causais da doença não são totalmente conhecidos, e contribuem de forma combinada, fazendo com que a análise seja extremamente complexa. Os desencadeantes principais são: radiação solar, gestação, uso de contraceptivos e outras alterações hormonais; enquanto outros agem tanto como desencadeantes quanto agravantes: radiação solar, gestação, cosméticos, fatores estressores físicos e psicológicos. Destes, os fatores mais referidos são a exposição à radiação UVA/UVB com 44,4% e gestação com 24,2%.¹³

A existência de lesões somente nas áreas fotoexpostas fortalece a hipótese da participação da radiação solar na patogênese. Além da existência de similaridade nas alterações histopatológicas na pele com melasma e na pele com alterações crônicas da radiação UV.²² A exposição solar prolongada estimula diretamente a produção de fatores melanogênicos pelos melanócitos e indiretamente nos queratinócitos e derme superficial.^{22,23}

A relação com a gestação é bem estabelecida. A doença acomete em torno de 10-25%, e pode ter início ou agravar-se com a gestação, com curso indefinido após sua resolução. Na maioria dos casos, a doença permanece em menor intensidade.^{23,24} Uma das hipóteses é a maior

circulação de estrógeno, progesterona e hormônios estimuladores de melanócitos, principalmente durante o terceiro trimestre.^{15,23}

A incidência elevada da doença na gestação torna indispensável a correta orientação das gestantes sobre a prevenção. O uso de métodos de barreira (chapéus, roupas protetoras) e proteção solar adequada é primordial. A fotoproteção, sem acréscimo de outros tratamentos, quando corretamente realizada, é suficiente para evitar o aparecimento e diminuir a intensidade da doença.²⁵

O percentual de pacientes com história familiar positiva é variável, porém muito importante na doença. Em estudo com 76 pacientes de Porto Rico, houve 21% de positividade para história familiar; enquanto em outro estudo, realizado em nove países, 48%. Neste último estudo, indivíduos com fototipos I-II apresentavam menor relação positiva, 38%, em comparação a 57% nos fototipos III-V.^{15,26}

Em estudo realizado na cidade de Botucatu-SP (Brasil), foi identificada associação de melasma e ancestralidade genética africana, diferentemente da europeia. Uma das hipóteses é de que a pele com melasma é similar na histologia à pele com fototipos altos.²⁷ Além disso, a ancestralidade indígena tem forte influência no desenvolvimento da doença, que explica a elevada frequência da doença em países latinos.²⁸

Em um estudo com 686 indivíduos em 68 famílias brasileiras, o padrão de segregação demonstrou um perfil de gene dominante associado a fatores de exposição como: radiação solar, uso de anticoncepcionais, gestação, uso de produtos irritativos.²⁹

O uso de contraceptivos consta como fator contribuinte, entre 8-34%. Acredita-se que os anticoncepcionais orais combinados atuam como desencadeante e agravante da doença pela atuação do estrógeno, assim como, alterações hormonais do ciclo menstrual.²⁸

FISIOPATOLOGIA E MELANOGÊNESE

A melanogênese da pele com melasma não está completamente elucidada, no entanto, sabe-se que a pele acometida apresenta múltiplas diferenças estruturais e funcionais dermoepidérmicas (Figura 5).

A epiderme revela melanossomos em maior número e mais maduros, melanócitos aumentados de tamanho com prolongamentos dendríticos proeminentes.³⁰ A avaliação histológica confere a pele com melasma hiperpigmentação em todas as camadas da epiderme, segundo Kang e colaboradores.¹⁰

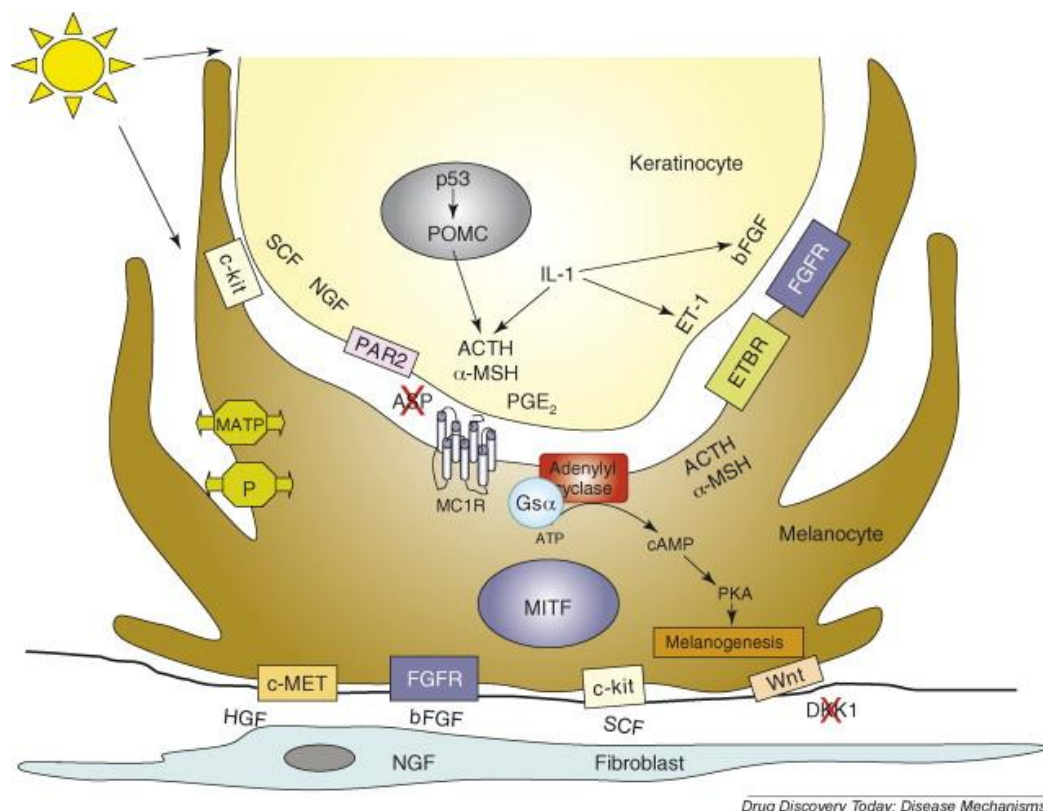


Figura 5. Melanogênese complexa e dependente de estímulos dérmicos e epidérmicos.³¹

A alteração ocorre também a nível funcional com atuação de diversos fatores regulatórios hormonais; adesão e agressão celular.³² Para a compreensão correta da fisiopatologia da doença, não só o entendimento morfológico mas a alteração funcional é necessária, pois nelas residem as complexas interações entre os fatores causais e a expressão da doença.

O mais importante estímulo melanogênico é o hormônio estimulador de melanócitos tipo alfa (α MSH) que está hiperexpresso no epitélio com melasma, e que se liga à proteína transmembrana conhecida como receptor melanocortina 1 (MC1R), também hiperexpressa no melasma. MC1R foi o primeiro gene descoberto em humanos para caracterização da cor da pele, controlando o tipo de melanina a ser produzida e regulando a pigmentação cutânea. O MC1R é

importante para o controle da quantidade de eumelanina e feomelanina nos melanossomas. É o maior responsável pelo fenótipo da pigmentação.⁹

MC1R apresenta alto polimorfismo, dessa forma, sua expressão é extremamente variada. A mutação Val92Met do MC1R foi associado ao melasma em um estudo com população Javanesa com fototipo IV, revelando a importância deste gene.³³

A porção dérmica apresenta elastose solar evidente e proliferação vascular aumentada, sem a confirmação de aumento no número de melanócitos. Há elevação de citocinas inflamatórias (IL17, iNOS, endotelinas), receptores de estrógeno e fatores de crescimento, comprovando que a derme, apesar de não ter atuação evidente na pigmentação, influencia na regulação do melasma.³²

As mudanças na pele ocasionadas pela radiação UV são bem estabelecidas, entretanto, pouco se sabe sobre o papel da LV no melasma. Considerando que a radiação solar recebida pela superfície terrestre contém de 12-14 vezes mais radiação LV do que UV, é fundamental avançarmos nesta área.³⁴ Assim, será possível melhorarmos um dos pilares do tratamento: a fotoproteção.

A resposta cutânea à radiação UVA (310-400nm) e ao UVB (290-320nm) foram vastamente estudadas. UVA é subdividida em UVA1 e UVA2, e ambas conferem pigmentação imediata e persistente. A coloração imediata é acinzentada e evolui para marrom, sem a presença de eritema. A LV promove pigmentação marrom dose-dependente desde o início e persistente pigmentação após duas semanas, com eritema que desaparece após 2h.³⁵

Em relação ao eritema, UVA causa pico em 4h; UVB em fototipos baixos em semanas e fototipos altos em dias e LV imediatamente com diminuição em 2h. A pigmentação no UVA é imediata e evolui como bronzeamento. UVB causa bronzeamento precedido pelo eritema e a LV, pigmentação sustentada e bronzeamento apenas nos fototipos mais altos.³⁶

Em estudo realizado na Índia, foram comparadas as radiações UV, LV e luz solar total para os fototipos IV-V. A pigmentação imediata ocorreu em todas as amostras, maior na luz solar total; menor na LV, mas não menos significativa que a UV. Todos os resultados foram dose-dependente.³⁴

É relevante considerar os fototipos na análise das radiações; porque fototipos diferentes possuem respostas variadas,³⁶ entretanto, muitos estudos foram realizados com fototipos baixos. No estudo supracitado de Mahmoud e equipe, um grupo com fototipo II foi irradiado com UVA1 e LV sem resposta de pigmentação em nenhum dos casos, corroborando este argumento.³⁵

AVALIAÇÃO CLÍNICA E QUALIDADE DE VIDA

A pele é o maior e mais visível órgão do corpo humano e as dermatoses são responsáveis por alto impacto na vida dos indivíduos. Além disso, quadros emocionais podem agravar doenças dermatológicas pré-existentes, criando um círculo vicioso.

A Organização Mundial de Saúde define saúde como “um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não apenas ausência de afecções e enfermidades.” Neste sentido, é essencial contemplar os aspectos inerentes a qualidade de vida dos pacientes. Com a ampliação da visão sobre o ser humano como mente e corpo, foi necessário desenvolver métodos de avaliação acerca do tema.

As doenças dermatológicas perfazem um total importante das queixas dos pacientes, e, apesar da baixa letalidade, geram grande transtorno nas relações interpessoais, autoimagem e nas atividades laborais. Entretanto, continuam desvalorizadas por profissionais de saúde, políticas públicas e pelos próprios pacientes.¹⁸

O acometimento do melasma nas áreas fotoexpostas acarreta impacto negativo, já que distorce a autoimagem e eleva o nível de insatisfação, ansiedade e desordens psicológicas.³⁷ Diferentes instrumentos foram criados para avaliar os diversos aspectos das doenças, alguns gerais e outros específicos.

O MELASQoL (*Melasma Quality of Life Scale*), desenvolvido em 2003, é o principal instrumento específico para avaliar a qualidade de vida em pacientes com melasma. É composto de 10 perguntas (Quadro 1) e possui adaptações ao redor do mundo pela mudança de linguagem. Cada item é respondido em uma escala de um a sete (1-7) e a pontuação vai de 7-70 pontos, quanto maior a pontuação, maior o impacto da qualidade de vida dos pacientes.³⁸

A utilização do instrumento suporta críticas de que as etapas de adequação e validação do instrumento não foram seguidas e sua dimensionalidade é limitada.³⁹

Quadro 1. MELASQoI-PB (versão em português brasileiro).

Em uma escala de 1 (pouco incômodo) e 7 (incômodo excessivo), considerando a sua doença, melasma, como você se sente em relação à:

1. A aparência da sua pele
2. Frustração pela condição da sua pele
3. Constrangimento pela condição da sua pele
4. Sentindo-se depressivo pela condição da sua pele
5. Os efeitos da condição da sua pele no relacionamento com outras pessoas (por ex: interações
6. Os efeitos da condição da sua pele sobre seu desejo de estar com pessoas
7. A condição da sua pele prejudica a sua demonstração de afeto
8. As manchas da pele fazem você se sentir menos atraente para os outros
9. As manchas da pele fazem você se sentir menos importante ou produtivo
10. As manchas da sua pele afetam seu senso de liberdade

O mMASI, é instrumento de medida específico para a doença desenvolvido para quantificar a gravidade da doença e a evolução do tratamento. São três os aspectos analisados: área de envolvimento, intensidade e homogeneidade. Os locais observados são a região frontal, o malar direito, o malar esquerdo e o mento. Diversos cálculos são realizados até conferir um valor entre 0-48 pontos, quanto maior a pontuação mais severa a doença.⁴⁰

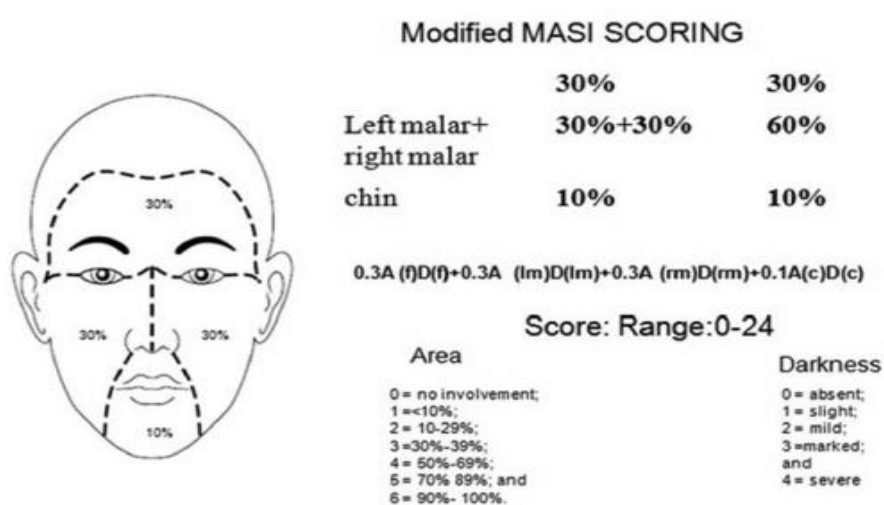


Figura 6. Cálculo do mMASI e representação das áreas faciais

Quadro 2. mMASI. Esquema de cálculo do índice de gravidade do melasma simplificado. O escore total varia de 0 a 24.

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

*Categorias: 0 nenhuma, 1 leve, 2 média, 3 marcante e 4 máxima.

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

Na cidade de Botucatu-SP (Brasil), foi desenvolvido e validado um questionário que abrangesse diversos aspectos da vida dos pacientes com melasma. Utilizou-se paralelamente à avaliação, escalas já estabelecidas como: mMASI, MELASQoI, DLQI, dados demográficos; o nome dado foi HRQ-Melasma. Conta com 19 perguntas divididas em quatro dimensões: física/aparência; social/profissional; psicológica e tratamento. As perguntas são subdivididas em 5 itens de zero a quatro (0=nunca; 1=raramente, 2= as vezes, 3 frequentemente, 4=sempre). Após completa realização pontos são somados e, o resultado é diretamente proporcional ao impacto da doença.³⁷

TRATAMENTO

A terapêutica do melasma é desafiadora, já que a doença é recidivante e, não raro, refratária ao tratamento. Atualmente, a melhor estratégia consiste em combinar as opções atuando nos diferentes aspectos da patogênese.

Individualizar os casos, realizar as orientações preventivas e manter a aderência proporciona melhores resultados. As opções variam desde intervenções tópicas (fotoprotetores, despigmentantes individuais ou combinados); orais e físicas (microagulhamento, laser).⁴¹ É indispensável a adesão do paciente ao tratamento, pois grande parte está atrelado a rotina diária de cuidados da pele.

A educação em relação à adequada exposição solar é fundamental ao médico dermatologista, que deve orientar aos pacientes os horários a ser evitados para a boa resposta terapêutica. Deve levar em conta características pessoais como: idade, gênero, atividade laboral, localização geográfica, fototipo.

A fotoproteção é de fundamental importância na boa resposta ao tratamento e sua manutenção. As características ideais contam com um fator de proteção maior que 30; espectro de proteção amplo com cobertura para UVA, UVB e LV; presença de compostos como o óxido de zinco, qualificando-o como filtro físico; a correta aplicação e reaplicação, boa tolerabilidade, baixa toxicidade e reações alérgicas.⁴²

O papel da fotoproteção relacionada à LV não está completamente esclarecido. Estudo com pacientes gestantes comprovou melhora importante da aplicação filtro solar UVB + UVA sem cor e sem aplicação de despigmentantes.²⁵

Atualmente, os protetores atuam na proteção UV sem considerar a LV de forma sistemática como potencial agente de piora da pigmentação. Em estudo realizado na Universidade de San Potosi, no México, 68 pacientes selecionadas de forma randomizada, participaram de estudo duplo cego recebendo hidroquinona 4% e protetor solar-UV e hidroquinona 4% e protetor solar UV + LV. Após 8 semanas a avaliação clínica, aplicação mMASI e avaliação histológica revelou melhora significativa dos dois grupos, porém, o segundo obteve resultados ainda melhores com relevância estatística apenas pela incorporação da proteção a LV.⁴³

Dois tipos de filtros solares estão disponíveis no mercado, os físicos (inorgânicos) e químicos (orgânicos). Os filtros físicos têm em sua composição óxido de zinco e dióxido de titânio e possuem proteção estendida para LV; diferentemente dos filtros químicos, com sua proteção limitada a radiação UV. Dessa forma, o conhecimento das alterações provocadas pela LV é essencial para proteção solar adequada no melasma.

Medidas externas: a utilização de medidas como vestimentas, guarda-sol, chapéus e a não exposição ao sol em horários extremos são essenciais no tratamento da doença.⁴⁴

Referências bibliográficas

1. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymńska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii i Alergol.* 2013;30(1):30-41.
2. Casals E, Vázquez-Campos S, Bastús NG, Puentes V. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2008;27(8):672-683.
3. Ebanks JP, Koshoffer A, Wickett RR, et al. Epidermal keratinocytes from light vs. Dark skin exhibit differential degradation of melanosomes. *J Invest Dermatol.* 2011;131(6):1226-1233.
4. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: A clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol.* 2014;89(5):771-782.
5. Lee AY. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatologica Sin.* 2014;32(4):233-239.
6. Tamler C, Fonesca RMR, Pereira FBC, Barcaui CB. Classification of melasma by dermoscopy : comparative study with Wood ' s lamp. *Surg Cosmet Dermatology.* 2009;1(3):115-119.
7. Plenck JJ. *Doctrina de Morbis Cutaneis. Qua Hi Morbi in Suas Classes, Genera et Species Redingtur.* Vienna; 1776.
8. Miot LDB, Da Silva MG, Miot HA, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol.* 2007;82(6):529-534.
9. Miot LDB, Miot HA, Da Silva MG, Marques MEA. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol.* 2009;623-635.
10. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, et al. Melasma: Histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol.* 2002;146(2):228-237.
11. Tamega ADA, Miot LDB, Bonfietti C, Gige TC, Marques MEA, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2013;27(2):151-156.
12. K. G. M, C. K, S. S, Agrawal R. Melasma: Through the eye of a dermoscope. *Int J Res Dermatology.* 2016;2(4):113.
13. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: A multicenter study. *Int J Dermatol.* 2014;53(4):440-444.
14. Kaliyadan F, Kulkarni V. Types of Variables, Descriptive Statistics, and Sample Size. *Indian Dermatol Online J.* 2017;8(1):487-489.
15. Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm MC. Melasma: A clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol.* 1981;4(6):698-710.
16. Wiryasa SA, de Castro Maymone MB, Widjajahakim R, Vashi NA. Subclinical melasma: Determining disease extent. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(2):e41-e42.
17. Costa MC, Eljaiek HV, Abraham LS, Azulay-Abulafia L, Ardigo M. In vivo reflectance confocal microscopy in a typical case of melasma. *An Bras Dermatol.* 2012;87(5):782-784.
18. Miot HA, Penna G de O, Ramos AMC, et al. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). *An Bras Dermatol.* 2018;93(6):916-928.
19. I. Al-Hamdi K, J. Hasony H, L. Jareh H. Melasma in Basrah: a Clinical and Epidemiological Study. *Med J Basrah Univ.* 2008;26(1):1-5.
20. Ishiy PS, e Silva LR, Penha MÁ, Handel AC, Miot HA. Skin diseases reported by workers from UNESP campus at Rubião Jr, Botucatu-SP (Brazil). *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):529-531.
21. Tendero MPA, Romero IB, Rincón JMR, et al. Dermatoses in Latin American immigrants seen in a tertiary hospital. *Eur J Dermatology.* 2009;19(2):157-162.
22. Lee AY. Recent progress in melasma pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(6):648-660.
23. Young Kang H, Ortonne JP. Melasma Update. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100(SUPPL. 2):110-113.
24. Scheinfeld NS. Melasma. *Ski Dermatology Clin.* 2007:35-37.
25. Lakhdar H, Zouhair K, Khadir K, et al. Evaluation of the effectiveness of a broad-spectrum sunscreen in the prevention of chloasma in pregnant women. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2007;21(6):738-742.
26. Ortonne J, Arellano I, Berneburg M, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2009;23:1254-1262.

27. D'Elia MPB, Brandão MC, de Andrade Ramos BR, et al. African ancestry is associated with facial melasma in women: A cross-sectional study. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):1-7.
28. Handel AC, Miot HA, Lima PB, Miot LDB, Tonolli VM. Risk factors for facial melasma in women a case-control study. *Br J Dermatol.* 2014;171(3):588-594.
29. Holmo NF, Ramos GB, Salomão H, et al. Complex segregation analysis of facial melasma in Brazil: evidence for a genetic susceptibility with a dominant pattern of segregation. *Arch Dermatol Res.* 2018;310(10):827-831.
30. Kang HY, Ortonne JP. What should be considered in treatment of melasma. *Ann Dermatol.* 2010.
31. Borovansky J, Riley PA. *Melanins and Melanosomes. Biosynthesis, Biogenesis, Physiological and Pathological Functions.*; 2008.
32. Espósito ACC, Brianezi G, de Souza NP, Miot LDB, Marques MEA, Miot HA. Exploring pathways for sustained melanogenesis in facial melasma: an immunofluorescence study. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(4):420-424.
33. Suryaningsih BE, Sadewa AH. Association between heterozygote Val92Met MC1R gene polymorphisms with incidence of melasma : a study of Javanese women population in Yogyakarta. 2019:489-495.
34. Ramasubramaniam R, Roy A, Sharma B, Nagalakshmi S. Are there mechanistic differences between ultraviolet and visible radiation induced skin pigmentation? *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(12):1887-1893.
35. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130(8):2092-2097.
36. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. *Photochem Photobiol Sci.* 2013;12(1):54-64.
37. Pollo CF, Meneguín S. evaluating quality of life in melasma (HRQ-melasma). *An Bras Dermatol.* 2018;16(3):391-396.
38. 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 Dermatology Venereol.* 2008;22(6):655-662.
39. Maranzatto C, Miot H, Miot L, Meneguín S. version of melasma quality of life scale (MELASQoL-BP) *. *An Bras Dermatol.* 2016;91(4):422-428.
40. Pandya AG, Hynan LS, Bhore R, et al. Reliability assessment and validation of the Melasma Area and Severity Index (MASI) and a new modified MASI scoring method. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64(1):78-83.e2.
41. Cohen PR. Melasma treatment: A novel approach using a topical agent that contains an anti-estrogen and a vascular endothelial growth factor inhibitor. *Med Hypotheses.* 2017;101:1-5.
42. Schalka S, Steiner D, Ravelli FN, et al. Brazilian consensus on photoprotection. *An Bras Dermatol.* 2014;89(6):1-74.
43. Castanedo-Cazares JP, Hernandez-Blanco D, Carlos-Ortega B, Fuentes-Ahumada C, Torres-Álvarez B. Near-visible light and UV photoprotection in the treatment of melasma: A double-blind randomized trial. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2014;30(1):35-42.
44. Cestari, T.. I Arellano, D Hexsel JO. Melasma in Latin America: options for therapy and treatment algorithm. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2009;23(9):1083-1087.

3. OBJETIVOS

1. Padronizar um modelo de cultura organoide primário cutâneo para estudar a melanogênese induzida por radiações (UVA, UVB e luz visível).
2. Determinar a resposta melanogênica do melasma facial em comparação com a pele normal adjacente após irradiação com UVB, UVA ou luz visível em cultura organoide primária cutânea.

4. PRIMEIRO ARTIGO

Publicação (formato): Artigo de investigação – Anais Brasileiros de Dermatologia

Seção: Artigo original

Título: Padronização de cultura organoide para avaliação da melanogênese induzida por UVB, UVA e luz visível.

Title: Standardization of organoid culture for evaluation of melanogenesis induced by UVB, UVA and visible light.

Autores:

Thainá Oliveira Felicio Olivatti

Estudante de medicina da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: thainaolivatti18@gmail.com

ORCID: 0000-0002-4719-4821

Abreviatura: Olivatti, TOF

Giovana Piteri Alcantara

Dermatologista, Mestranda no Programa MEPAREM, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Email: giovanaalcantara.dermato@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-6749-7160

Abreviatura: Alcantara, GP

Ana Cláudia Cavalcante Espósito

Dermatologista, MsC, Doutoranda do programa de Pós-graduação da Patologia, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: anaclaudiaesposito@gmail.com

ORCID: 0000-0001-9283-2354

Abreviatura: Espósito, ACC

Márcia Guimarães da Silva

Bióloga, PhD, Professor Assistente do Departamento de Patologia FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: mgsilva@fmb.unesp.br

ORCID: 0000-0002-4663-7926

Abreviatura: da Silva, MG

Hélio Amante Miot

Dermatologista, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: heliomiot@fmb.unesp.br

ORCID: 0000-0002-2596-9294

Abreviatura: Miot, HA

Local onde o trabalho foi realizado:

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

Endereço de correspondência:

Prof. Hélio Amante Miot.

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

Fone/FAX: +55 14 38824922

Email: helio.a.miot@unesp.br

Conflito de interesses: Nenhum.

Financiamento: CNPq (PIBIC no.148501/2018-4); FUNADERM (001/2019).

Participação no trabalho:

Concepção do estudo: Miot, HA; Espósito ACC

Coleta dos dados: Olivatti TOF; Alcantara GP

Análise dos resultados: Miot HA; Espósito ACC; da Silva, MG

Escrita do texto: Miot HA; Espósito ACC; Olivatti TOF; Alcantara GP

Revisão e aprovação do texto final: Miot HA; Espósito ACC; Olivatti TOF; Alcantara GP; da Silva, MG

Resumo:

FUNDAMENTOS: Culturas organoides são cultivos primários que mantêm características arquiteturais, relações entre as células e matriz extracelular. São alternativa para investigação fisiopatológica ou terapêutica, comparados aos ensaios animais e *in vitro*.

OBJETIVOS: Desenvolvimento de modelo de cultura organoide cutânea, visando o estudo da melanogênese induzida por radiações.

MÉTODOS: Estudo de validação, que envolveu biópsias da pele retroauricular de 10 pacientes adultos. Pares de fragmentos foram acondicionados em meio de cultura específico. Uma amostra era irradiada com diferentes doses de UVB, UVA ou luz visível, e a outra, mantida ao abrigo da luz, por 72h. A viabilidade dos tecidos foi avaliada a partir de parâmetros morfológicos e arquiteturais da histologia, e a expressão do gene GAPDH, por *real time* PCR. A pigmentação melânica induzida pelas radiações foi padronizada em função das doses de cada radiação, e avaliada por análise de imagem digital (Fontana-Masson).

RESULTADOS: Padronizou-se a cultura primária de pele em temperatura ambiente, utilizando meio específico. As doses de UVB, UVA e LV (luz azul) que induziram melanogênese diferencial foram: 166 mJ/cm², 1,524 J/cm² e 40 J/cm². A expressão do gene constitucional GAPDH não diferiu entre a amostra de pele processada imediatamente após a coleta do tecido, e a amostra cultivada por 72h no protocolo padronizado.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO: Estudo preliminar que avaliou apenas a viabilidade e integridade do sistema melanogênico, e o efeito das radiações isoladamente.

CONCLUSÕES: O modelo padronizado manteve viável a função melanocítica por 72h sob temperatura ambiente, permitindo a investigação da melanogênese induzida por diferentes radiações.

Palavras-chave: Fotobiologia, Melasma, Cultura organoide.

Abstract

Background: Organoid cultures are primary cultures that maintain architectural characteristics, relationships between cells and extracellular matrix. They are alternatives for pathophysiological or therapeutic investigation, compared to animal and in vitro tests.

Objective: Development of cutaneous organoid culture model, aiming at the study of radiation-induced melanogenesis.

Method: A validation study, which involved biopsies of the skin of the back of 10 adult patients ear. One sample was irradiated with different doses of UVB, UVA or visible light, and the other, held out of the light, for 72h. The viability of the tissues was evaluated from the morphological and architectural parameters of the histology, and the expression of the GAPDH gene, by real-time PCR. The radiation-induced melanin pigmentation was standardized according to the doses of each radiation and evaluated by digital image analysis (Fontana-Masson).

Results: The primary skin culture was standardized at room temperature using specific medium. The doses of UVB, UVA and LV (blue light) that induced differential melanogenesis were: 166 mJ / cm², 1.524 J / cm², and 40 J / cm². The expression of the GAPDH constitutional gene did not differ between the sample of skin processed immediately after tissue collection, and the sample cultured for 72 hours in the standardized protocol.

Study limitations: A preliminary study that evaluated only the viability and integrity of the melanogenic system, and the effect of the radiation alone.

Conclusions: The standardized model maintained viable melanocytic function for 72 hours at room temperature, allowing the investigation of melanogenesis induced by different radiations.

Key-words: Photobiology, Melanosis, Organoids

TEXTO:

Introdução

A investigação fisiopatológica e de respostas terapêuticas de certas dermatoses, *in anima nobile*, pode ser limitada por elementos ligados à toxicidade de tratamentos, necessidade de diferentes grupos comparativos, aspectos ligados a adesão em ensaios terapêuticos, além da incerteza quanto à resposta biológica de uma intervenção (p.ex. carcinogênese).

A experimentação animal aumenta a extensão de possibilidades de pesquisa pelo menor custo, maior acessibilidade aos sujeitos e maior controle de exposição e influência ambiental.¹ Entretanto, as respostas fisiológicas dos animais podem não se assemelhar aos humanos (p.ex. melanogênese), o que pode levar a conclusões equivocadas.² Além disso, uma série de doenças cutâneas não possuem modelos animais (p.ex. melasma), levando a necessidade de outros processos investigativos.

As simulações computacionais de fenômenos biológicos são uma opção à experimentação com seres vivos, e fornecem resultados bastante verossímeis quando simulam interações entre variáveis largamente conhecidas do ponto de vista experimental. Infelizmente, as variáveis que interferem em processos cutâneos (p.ex. melanogênese), ainda não são completamente elucidadas, assim como sua interação com os demais elementos externos.³

Culturas celulares humanas primárias ou de linhagens comerciais (p.ex. HaCaT) são largamente utilizadas em pesquisa fisiopatológica ou de resposta a estímulos específicos. Apesar da homologia com os tecidos humanos, as culturas de linhagens celulares não contemplam a interação entre os diferentes tipos celulares que interagem na pele (p.ex. unidade epidermo-melânica).⁴

Sistemas comerciais de culturas celulares múltiplas (p.ex. pele 3D: queratinócitos, melanócitos e fibroblastos) são propagadas como uma solução para perceber a interação entre as células da pele, sendo mais verossímeis com a estrutura tecidual do hospedeiro.⁵⁻⁷ Entretanto, as linhagens são usualmente de doadores diferentes, com padrões de replicação algo diverso do que se encontra no tecido, também, não apresentam endotélio, células dendríticas, células de Merkel, que, mesmo sendo pouco numerosas no tecido, podem oferecer alguma interação relevante, dependendo do fenômeno estudado. Além disso, até o momento, culturas 3D e co-culturas celulares comerciais de pele ainda não caracterizam certas doenças.⁷⁻⁹

As culturas organoides são cultivos teciduais primários que mantêm as características arquiteturais e as principais relações entre os diferentes tipos celulares, além da matriz extracelular.¹⁰⁻¹² Apresentam a vantagem adicional de poderem ser amostrados a partir da pele sã e da pele com doença do mesmo hospedeiro, favorecendo a comparação *ex vivo* entre os locais.^{13,14} A pele é um tecido relativamente viável à cultura organoide, com descrição de manutenção funcional por mais de sete dias, à temperatura ambiente.^{12,15-19}

A melanogênese é um processo complexo, que depende principalmente da ação da radiação ultravioleta (UVA e UVB) sobre a unidade epidermo-melânica, com importante regulação

parácrina, mas que também sofre interferência de elementos da derme.^{20,21} A luz visível (LV) foi descrita como promotora de melanogênese em fototipos elevados, e a fração mais biologicamente ativa da LV na pele compreende a faixa azul-violeta (400-500nm).²²

Nesse estudo, objetivamos a padronização de um modelo de cultura organoide a partir de um fragmento de pele, visando o estudo da melanogênese induzida por diferentes radiações.

Métodos

O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa da instituição (no. 2.700.889), e todos os participantes preencheram o termo de consentimento antes da inclusão no estudo.

Foram incluídos 10 voluntários adultos (>18 anos), atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP (Brasil), que se submeteram a biópsias da região retroauricular com *punch* 3mm, sob anestesia local (lidocaína 2%), após antissepsia com cloroexidine alcoólico (2%) e campo estéril, para manutenção da viabilidade das amostras. Os fragmentos foram seccionados no nível da derme profunda para evitar grande quantidade de adipócitos que interferem na completa submersão do fragmento no meio de cultura.

Os fragmentos cilíndricos foram divididos longitudinalmente em duas partes (semicíndros) equivalentes e armazenadas em meio específico DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, high glicose – D5796, Sigma Inc, UK),²³ em frasco plástico transparente estéril, segundo protocolo estabelecido por Ayres, para cultura organoide (padronização de viabilidade) em temperatura ambiente, para posterior dosimetria das radiações para melanogênese.²⁴ Um fragmento foi irradiado (imediatamente após a coleta), e o outro, mantido ao abrigo da luz, por 72h.

Os fragmentos foram irradiados com doses crescentes de UVA, UVB e LV a partir de fontes artificiais de UVB (230 μ W/cm²; fonte FS72T12/UVB/HO), UVA (1270 μ W/cm²; fonte Phillips TL 100W/10R) e luz LED (110 mW/cm² na faixa azul-violeta; fonte GBRLUX 200W), com distância padronizada de 10cm. As radiações foram iniciadas como 166 mJ/cm², 1,270 J/cm² e 40 J/cm² e acrescidos 20% de radiação cada amostra consecutiva, até identificar pigmentação diferencial. Foi determinada a absorbância da parede dos frascos plásticos para cada radiação. Um volume de 10ml do meio de cultura foi estabelecido para garantir a submersão do fragmento.

A viabilidade dos tecidos foi avaliada a partir de parâmetros morfológicos e arquiteturais da histologia (H&E), e a expressão quantitativa do gene constitucional GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) nas peles recém-coletadas, *versus* as cultivadas em 72h, por *real time* PCR. O gene GAPDH codifica uma proteína elementar para a realização de funções celulares básicas (p.ex. metabolismo energético), utilizada comumente como controle positivo em reações de *real time* PCR, e representa a manutenção das funções metabólicas basais da célula.

A quantificação do *real time* PCR foi realizada no laboratório da patologia (Unesp-Botucatu, SP) a partir da amplificação do gene-alvo GAPDH por primer e sonda validados TaqMan. Aliquotas do cDNA (3 μ L) extraído das amostras cutâneas foram submetidas à reação do PCR usando o sistema TaqMan. Cada reação utilizou 15 μ L do TaqMan Gene Expression Master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 1.0 to 1.5 μ L do conjunto de primers. A amplificação foi

realizada em um equipamento ABI7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) usando parâmetros padronizados pelo fabricante. Os dados foram processados pelo SDS Software System 7300 e os resultados expressos como ciclo limiar (Ct) para determinar a expressão do cDNA do GAPDH a partir do número de ciclos necessários para atingir o limite de detecção do sinal fluorescente, que foi pré-definido entre 0,2 e 0,3.

A pigmentação melânica induzida pelas radiações foi padronizada em função das doses de cada radiação em função do aumento de mais de 10% da pigmentação da camada basal após mantidas 72h no meio de cultura, avaliada por análise de imagem digital das lâminas coradas pelo Fontana-Masson.²⁵ A padronização foi concluída quando os critérios acima fossem atingidos e reproduzidos.

Resultados

Padronizou-se a cultura primária de pele em temperatura ambiente, utilizando meio DMEM. As doses de UVB, UVA e LV que induziram melanogênese diferencial foram: 166 mJ/cm², 1,524 J/cm² e 40 J/cm² (componente luz azul-violeta). A absorbância dos frascos plásticos foi de cerca de 50% para todas as radiações.

O aumento da melanogênese da camada basal pôde ser percebido pela coloração de Fontana-Masson após 72h de cultura (Figuras 1-3).

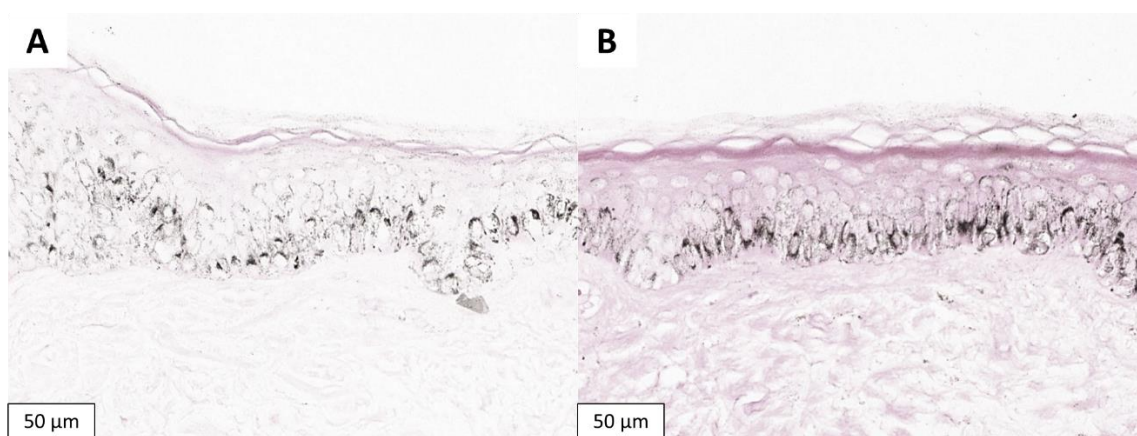


Figura 1. Corte histológico de cultura organoide (72h) de pele retroauricular (Fontana-Masson, 400x). (A) Cultura não irradiada; (B) cultura irradiada com 166 mJ/cm² de UVB. Destaca-se o aumento da melanização da camada basal da epiderme.

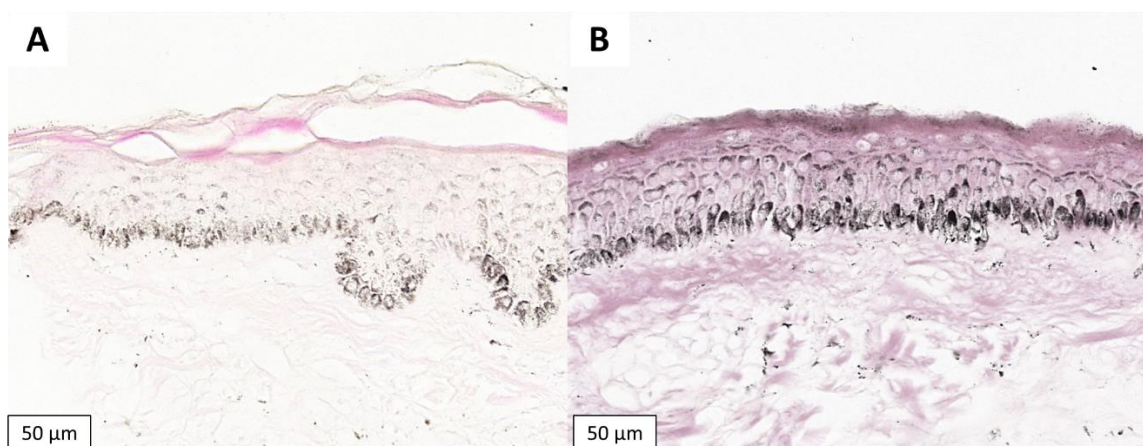


Figura 2. Corte histológico de cultura organoide (72h) de pele retroauricular (Fontana-Masson, 400x). (A) Cultura não irradiada; (B) cultura irradiada com 1,524 J/cm² de UVA. Destaca-se o aumento da melanização da camada basal da epiderme.

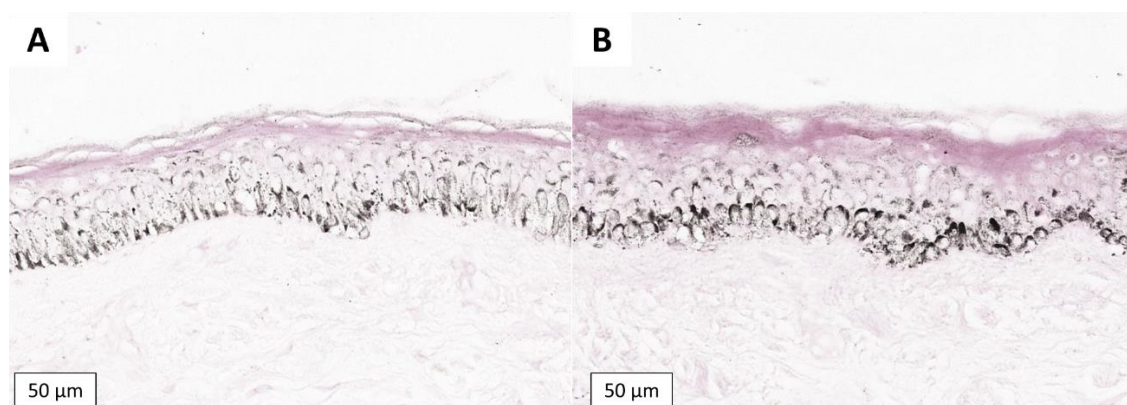


Figura 3. Corte histológico de cultura organoide (72h) de pele retroauricular (Fontana-Masson, 400x). (A) Cultura não irradiada; (B) cultura irradiada com 40 J/cm² de luz visível (azul-violeta 400-500nm). Destaca-se o aumento da melanização da camada basal da epiderme.

No protocolo validado, não foram observados destacamentos epidérmicos, picnose ou necrose de queratinócitos. Uma das culturas apresentou contaminação após 72h e foi descartada, totalizando 9 pacientes para a padronização.

A expressão do gene constitucional GAPDH foi equivalente entre a amostra de pele processada imediatamente após a coleta do tecido, e a amostra cultivada por 72h no protocolo padronizado (Figura 4).

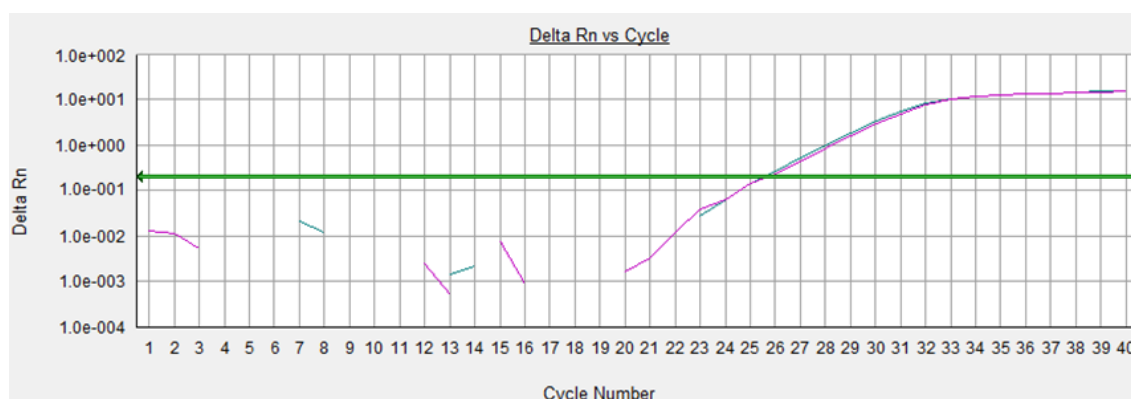


Figura 4. Expressão gênica de culturas organoides (72h) de pele retroauricular. Curvas obtidas a partir de amostras amplificadas por *real time* PCR para o gene endógeno GAPDH, cujos números de ciclo de amplificação dos limiares (Ct) foram calculados. Observa-se crescimento paralelo das curvas de amplificação gênica das duas amostras, especialmente a partir do ciclo 26.

Discussão

O presente estudo padroniza uma alternativa reprodutível de baixo custo para cultura organoide da pele para o estudo da melanogênese. O modelo padronizado manteve viável a função melanocítica por 72h sob temperatura ambiente, permitindo a investigação da melanogênese induzida por diferentes radiações. A abundância tecidual da pele, fácil acessibilidade à coleta de material, manutenção arquitetural e funcional incentivam o uso de culturas cutâneas organoides na pesquisa dermatológica.^{6,15,18,25,26}

Culturas de melanócitos são utilizados para estudo de inibidores da melanogênese. Entretanto, em monoculturas, melanócitos irradiados sintetizam mais feomelanina que eumelanina, que depende da interação com queratinócitos. A investigação de fenômenos ligados à eumelanogênese é favorecida, portanto, por modelos organoides que mantenham a influência de diferentes grupos celulares.^{24,27}

Há diversas variações de meios de cultura, temperaturas e tempo de cultivo que ultrapassam o escopo desse texto. De forma geral, culturas organoides cutâneas que utilizam meios ar-líquidos são mais empregadas no estudo da queratinização enquanto culturas em suspensão (como a utilizada neste estudo), permitem melhor perfusão e viabilidade.¹²

Fragmentos de menor dimensão (p.ex. 2mm²) tendem a apresentar maior viabilidade e preservação arquitetural, devido a embebição mais homogênea pelo meio de cultura e distribuição de oxigênio ao tecido.^{19,26} Em nosso estudo, os fragmentos de 3mm foram seccionados ao meio, com adequada preservação da função. Um dos fragmentos que foi inadvertidamente cultivado sem a secção longitudinal apresentou evidente picnose nuclear no centro da peça (caso não incluído no estudo, dados não mostrados).

Modernos meios de conservação e transporte de tecidos fornecem subsídio para a formação de bancos de pele e também ao desenvolvimento de culturas organoides para a padronização de experimentos.²⁸⁻³¹ O emprego de soro bovino aumenta o potencial de viabilidade das culturas, porém, compromete a arquitetura do tecido, em função do tempo.¹² O cultivo em

temperatura corporal (37°C) também aumenta a viabilidade do tecido assim como sua taxa metabólica, potencializando a exploração de fenômenos oxidativos e mitogênicos como os envolvidos na carcinogênese.

Culturas organoides são mantidas fora da interação com o organismo, sem estímulos térmicos, neurológicos, hormonais, imunitários e sofrem hipóxia, o que penitencia suas propriedades teciduais em função do tempo.^{12,32} Os desafios e estímulos aos fragmentos devem ser impostos precocemente a fim de preservar as respostas de forma mais verossímil.

A melanogênese da camada basal oriunda do estímulo precoce pôde ser percebida de forma evidente no modelo proposto. A análise digital da melanogênese basal aumenta a sensibilidade da percepção do fenômeno. Curvas de dose-resposta para cada tipo de radiação (isoladas ou em combinação) devem ser exploradas posteriormente, assim como a resposta melanogênica no melasma.

Uma limitação adicional ao uso de fragmentos de pele total para estudos genômicos acontece pela heterogeneidade das células presentes na amostra, e o aumento da expressão de um gene não pode ser atribuído a um único tipo celular. Para isso, culturas primárias de células, *single-cell*, ou técnicas de microdissecção a laser podem ser utilizadas.³³

Culturas organoides cutâneas são mais disponíveis e de menor custo que culturas 3D, apresentam maior complexidade arquitetural contemplando a totalidade de células residentes (p.ex. endotélio, nervos, mastócitos) e matriz extracelular, podem representar mais adequadamente diferenças topográficas, permitem de forma semelhante manipulação genética e metabólica, assim como o isolamento celular e podem ser oriundas primariamente da dermatose, com possibilidade de comparação com a pele normal do mesmo indivíduo. Por outro lado, apresentam cinética menos previsível e não podem ser constituídas a partir de engenharia genética (p.ex. CRISPR, *knock-out* genes). Ambas as formas de cultura têm limitação experimental em função do tempo e não mantêm o microbioma cutâneo.¹² Essas características devem ser ponderadas na escolha de modelos experimentais, que devem ser adequadamente padronizados e validados para cada intervenção.

A irradiação da luz solar, ao meio dia, no interior do Brasil (Latitude: 22° 53' 09"S; Longitude: 48° 26' 42"W; Altitude: 804m; dia de 09-dez-2018), foi de 0,5 mW/cm² (UVB); 1,7 mW/cm² (UVA) e 0,2 W/cm² (luz azul-violeta). O que leva a hipótese de que menos de 15 minutos de exposição solar desprotegida potencialmente induziriam a pigmentação, da camada basal, guardadas as limitações da comparação com as radiações independentes, enquanto o efeito das radiações combinadas, ou com diferentes regimes de fotoproteção possam apresentar comportamentos diferentes.

Estudos experimentais *in vivo*, resultaram em pigmentação cutânea efetiva pela LV a partir de 40 J/cm² em indivíduos melanodérmicos (Fitzpatrick IV e V), mas não em fototipos claros. Já a pigmentação por UVA1 (340-400nm) pôde ser percebida a partir de 5 J/cm² em participantes com fototipos mais escuros³⁴

Radiações solares representam um *continuum* de frequências eletromagnéticas que interagem com os tecidos biológicos e promovem estímulos diversos.³⁵ Por razões de

sistematização, os efeitos biológicos das radiações são estudados a partir de comprimentos de onda separados, porém, há certa interação entre eles.³⁶ No caso da pigmentação cutânea, a LV promove maior intensidade e persistência à pigmentação induzida pelo UVA1.^{22,37}

As fontes de UVA, UVB e LV deste estudo promoveram irradiações independentes, já que não apresentaram leituras significativas dos outros comprimentos de onda (dados não mostrados). Isso pode ser relevante porque estudos clássicos de pigmentação, como o de Mahmoud e colaboradores, empregaram fontes de LV que emitiam 0.19% de UVA e 1.5% de infravermelho; assim como fontes de UVA1 que apresentavam 0,12% de UVA2 e 0,0001% de UVB.³⁴ O efeito da heterogeneidade das radiações nos grupos dificulta sua comparação com resultados de fontes homogêneas.

Conclusão

Foi padronizado um modelo de cultura organoide para avaliação da melanogênese induzida por UVB, UVA e LV.

Referências

1. Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;32:56-67.
2. Bastonini E, Kovacs D, Picardo M. Skin Pigmentation and Pigmentary Disorders: Focus on Epidermal/Dermal Cross-Talk. *Ann Dermatol* 2016;28:279-89.
3. Handel AC, Miot LD, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol* 2014;89:771-82.
4. Minuth WW, Sitterling M, Kloth S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res* 1998;291:1-11.
5. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* 2015;230:16-26.
6. Yoshida GJ, Saya H, Zouboulis CC. Three-dimensional culture of sebaceous gland cells revealing the role of prostaglandin E2-induced activation of canonical Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438:640-6.
7. Haycock JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *3D cell culture: Springer*; 2011:1-15.
8. Kim Y, Park N, Rim YA, et al. Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2018;9:217.
9. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Full-Thickness Human Skin Equivalent Models of Atopic Dermatitis. *Methods Mol Biol* 2019;1879:367-83.
10. Bredenoord AL, Clevers H, Knoblich JA. Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science* 2017;355.
11. Mebarki M, Bennaceur A, Bonhomme-Faivre L. Human-cell-derived organoids as a new ex vivo model for drug assays in oncology. *Drug Discov Today* 2018;23:857-63.
12. Zhou L, Zhang X, Paus R, Lu Z. The renaissance of human skin organ culture: A critical reappraisal. *Differentiation* 2018;104:22-35.
13. Boisnic S, Branchet-Gumila MC, Le Charpentier Y, Segard C. Repair of UVA-induced elastic fiber and collagen damage by 0.05% retinaldehyde cream in an ex vivo human skin model. *Dermatology* 1999;199 Suppl 1:43-8.
14. Duong HS, Zhang Q, Kobi A, Le A, Messadi DV. Assessment of morphological and immunohistological alterations in long-term keloid skin explants. *Cells Tissues Organs* 2005;181:89-102.

15. Sarkany I, Gaylarde PM. Ultrastructural changes in human skin maintained in organ culture. *Br J Dermatol* 1970;83:572-81.
16. Hentzer B, Kobayasi T. Adult human skin maintained in organ culture. II. The ultrastructure of the cellular compartment of connective tissue. *Acta Derm Venereol* 1980;60:465-76.
17. Boisnic S, Branchet-Gumila MC, Nizri D, Ben Slama L. Histochemical and biochemical modifications induced by experimental irradiation of human skin maintained in survival conditions and modulation by application of an emulsion containing trolamine. *Int J Tissue React* 2003;25:9-18.
18. de Jesus Ribeiro C, Ohara MT, Gama P. Alternative model to human skin organ culture: a preliminary study with Leibovitz L15 medium. *Microsc Res Tech* 2005;66:139-44.
19. Varani J. Preservation of human skin structure and function in organ culture. *Histology and histopathology* 1998;13:775-84.
20. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013;88:76-83.
21. Imokawa G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 2004;17:96-110.
22. Ramasubramaniam R, Roy A, Sharma B, Nagalakshmi S. Are there mechanistic differences between ultraviolet and visible radiation induced skin pigmentation? *Photochem Photobiol Sci* 2011;10:1887-93.
23. Zeltinger J, Holbrook KA. A model system for long-term serum-free suspension organ culture of human fetal tissues: experiments on digits and skin from multiple body regions. *Cell Tissue Res* 1997;290:51-60.
24. Ayres E, Costa A, Eberlin S, Cleric S. Ex vivo study for evaluating the whitening activity of Pycnogenol® after ex-posure to ultraviolet and infrared radiations, and visible light. *Surg Cosmet Dermatol* 2015;7:303-7.
25. Miot HA, Brianezi G, Tamega Ade A, Miot LD. Techniques of digital image analysis for histological quantification of melanin. *An Bras Dermatol* 2012;87:608-11.
26. Hentzer B, Kobayasi T. Adult human skin maintained in organ culture: I. The ultrastructure of the acellular compartment of connective tissue. *Acta Derm Venereol* 1979;59:389-400.
27. Duval C, Smit NP, Kolb AM, Regnier M, Pavel S, Schmidt R. Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. *Pigment Cell Res* 2002;15:440-6.
28. Ahmed AK, Hahn DE, Hage JJ, Bleiker EM, Woerdeman LA. Temporary banking of the nipple-areola complex in 97 skin-sparing mastectomies. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:531-9.
29. Kagan RJ, Robb EC, Plessinger RT. Human skin banking. *Clin Lab Med* 2005;25:587-605.
30. Sheridan R, Mahe J, Walters P. Autologous skin banking. *Burns* 1998;24:46-8.
31. Arora M. Cell culture media: A review. *Mater methods* 2013;3:175.
32. Danso MO, Berkers T, Mieremet A, Hausil F, Bouwstra JA. An ex vivo human skin model for studying skin barrier repair. *Exp Dermatol* 2015;24:48-54.
33. Santoro S, Lopez ID, Lombardi R, et al. Laser capture microdissection for transcriptomic profiles in human skin biopsies. *BMC Mol Biol* 2018;19:7.
34. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol* 2010;130:2092-7.
35. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci* 2013;12:54-64.
36. Schalka S, Steiner D, Ravelli FN, et al. Brazilian consensus on photoprotection. *An Bras Dermatol* 2014;89:1-74.
37. Kohli I, Chaowattanapanit S, Mohammad TF, et al. Synergistic effects of long-wavelength ultraviolet A1 and visible light on pigmentation and erythema. *Br J Dermatol* 2018;178:1173-80.

5. SEGUNDO ARTIGO

Publicação (formato): Artigo de investigação

Seção: Artigo original

Título: Avaliação comparativa *ex vivo* da resposta melanogênica ao UVB, UVA e luz visível no melasma.

Title: *Comparative ex vivo evaluation of melanogenic response to UVB, UVA and visible light in melasma.*

Autores:

Giovana Piteri Alcantara

Dermatologista, Mestranda no Programa MEPAREM, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Email: giovanaalcantara.dermato@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-6749-7160

Abreviatura: Alcantara, GP

Thainá Oliveira Felício Olivatti

Estudante de medicina da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: thainaolivatti18@gmail.com

ORCID: 0000-0002-4719-4821

Abreviatura: Olivatti, TOF

Ana Cláudia Cavalcante Espósito

Dermatologista, MSc, Doutoranda do programa de Pós-graduação da Patologia, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: anaclaudiaesposito@gmail.com

ORCID: 0000-0001-9283-2354

Abreviatura: Espósito, ACC

Melissa Mari Yoshida

Estudante de medicina da Faculdade de Medicina, Unesp - Botucatu, Brasil.

Email: melissayoshida@hotmail.com

ORCID: 0000-0001-8566-0523

Abreviatura: Yoshida, M.M.

Hélio Amante Miot

Dermatologista, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: heliomiot@fmb.unesp.br

ORCID: 0000-0002-2596-9294

Abreviatura: Miot, HA

Autor correspondente:

Hélio Amante Miot

Departamento de Dermatologia e Radioterapia

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n

Rubião Júnior, Botucatu/SP, Brasil, 18618-970

E-mail: helio.a.miot@unesp.br

Conflito de interesse: Nenhum.

Financiamento: CNPq (PIBIC no.148501/2018-4); FUNADERM (001/2019).

Participação no trabalho:

Concepção do estudo: Miot, HA; Espósito ACC

Coleta dos dados: Alcantara GP; Olivatti TOF, Yoshida MM

Análise dos resultados: Miot HA; Espósito ACC

Escrita do texto: Miot HA; Alcantara GP; Espósito ACC, Yoshida MM

Revisão e aprovação do texto final: Miot HA; Espósito ACC; Alcantara GP; Olivatti TOF, Yoshida MM

Resumo

FUNDAMENTOS: A exposição solar é um dos fatores mais importantes na patogênese do melasma, entretanto, não se conhece o papel das radiações UVB, UVA e luz visível (LV) na melanogênese diferencial entre melasma e a pele normal adjacente, o que pode orientar medidas de fotoproteção e maior compreensão da fisiopatologia.

OBJETIVOS: Avaliar as respostas melanogênicas da pele com melasma facial e da pele normal adjacente a diferentes irradiações: UVB, UVA e LV, em modelo *ex vivo*.

MÉTODOS: Estudo *quasi-experimental*, *ex vivo* envolvendo fragmentos de pele facial de 22 portadores de melasma, sem tratamento há mais de 30 dias. Foram coletadas amostras de pele com melasma e normal adjacente, distantes até 2cm entre si, posteriormente, foram seccionadas longitudinalmente e armazenadas em 10mL do meio DMEM, em temperatura ambiente. Um fragmento foi acondicionado sob abrigo da luz, enquanto o outro foi exposto à radiação UVB, UVA e LV: 166mJ/cm², 1,524J/cm² e 40J/cm². As amostras foram cultivadas por 72h ao abrigo da luz, e processadas para coloração de Fontana-Masson com a finalidade de avaliar a pigmentação da camada basal, dendricidade e granulação de melanina.

RESULTADOS: A idade média (desvio-padrão) dos participantes foi 42 (10) anos, 21 eram do sexo feminino, quanto aos fototipos: III (46%), IV (27%) e V (27%). Houve efetiva melanogênese na camada basal no melasma e na pele normal adjacente após todas as irradiações ($p<0,01$), mediana de incremento: UVB (4,7% vs. 8,5%), UVA (9,5% vs. 9,9%) e LV (6,8% vs. 11,7%), sem diferença entre as topografias ($p=0.66$). Houve aumento na granulação da melanina (melanossomas mais grosseiros) somente após a irradiação com UVA e apenas na pele com melasma ($p<0,01$). Entretanto, a maior proeminência dos dendritos dos melanócitos ocorreu apenas na pele com melasma para irradiação com UVB e LV ($p<0,01$), sem diferença entre elas.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO: Estudo realizado em modelo *ex vivo*, com regimes de irradiações independentes para UVB, UVA e LV.

CONCLUSÃO: Houve resposta melanogênica tanto na pele com melasma como da pele normal adjacente induzida por UVB, UVA e LV. Os padrões morfológicos relacionados à fotobiologia da melanogênese sugerem que diferentes radiações promovam respostas individualizadas na pele com melasma.

Palavras-chave: Melasma, Raios Ultravioleta, Luz, Cultura organoide, Fotobiologia.

Abstract

BACKGROUND: Sun exposure is one of the most important factors in the pathogenesis of melasma. However, the role of UVB, UVA and visible light (VL) radiation in the differential melanogenesis between melasma and adjacent normal skin is unknown, which may guide photoprotection measures. and greater understanding of its pathophysiology.

OBJECTIVE: Evaluate skin responses with facial melasma and adjacent normal skin to different irradiations: UVB, UVA and VL in ex vivo model.

METHOD: Quasi-experimental study involving facial skin fragments of 22 melasma carriers without treatment. Melasma and adjacent normal samples were collected up to 2cm apart, later sectioned longitudinally and stored in 10mL DMEM medium at room temperature. One fragment was stored under light, while the other was exposed to UVB radiation, UVA and visible light: 166mJ/cm², 1,524J/cm² and 40J/cm². Samples were cultured for 72h in the dark and processed for Fontana-Masson staining to evaluate basal layer pigmentation, dendricity and melanin granulation.

RESULTS: The average age (standard deviation) of the participants was 42 (10) years, 21 were female, regarding the phototypes: III (46%), IV (27%) and V (27%). There was effective melanogenesis in melasma and adjacent normal skin after all irradiations ($p < 0.01$): median UVB increment (4.7% vs. 8.5%), UVA (9.5% vs. 9.9%) and VL (6.8% vs. 11.7%). The melanogenesis rate was higher in both topographies when compared VL to UVB irradiation ($p < 0.05$). Melanin granulation (coarser melanosomes) increased only after UVA irradiation and only in melasma skin ($p < 0.01$). However, the highest prominence of melanocyte dendrites occurred only in skin with melasma for UVB and VL irradiation ($p < 0.01$), with no difference between them.

STUDY LIMITATIONS: Skin culture study with independent irradiation regimes for UVB, UVA and VL.

CONCLUSIONS: There was a melanogenic response in both the skin with melasma and the adjacent normal skin induced by UVB, UVA and VL. The morphological patterns related to melanogenesis photobiology suggest that different radiation promotes individualized responses in melasma skin.

Key-words: Melasma, Ultraviolet Rays, Light, Organoids, Photobiology

INTRODUÇÃO

Melasma é hipermelanose crônica e adquirida resultado de uma disfunção da melanogênese: aumento da produção, transferência e maior maturidade dos melanossomos.¹ É uma condição frequente na rotina dermatológica, totalizando 3,6% das consultas dermatológicas segundo estudo da Sociedade Brasileira de Dermatologia em 2018.² Acomete, principalmente mulheres na idade fértil (25 a 50 anos) e fototipos intermediários (III a V). As lesões clínicas do melasma são caracterizadas como máculas, comumente simétricas, hipercrômicas, bem delimitadas, situadas nas topografias expostas ao sol, especialmente a face.³ A fisiopatologia ainda não é completamente esclarecida, aparentemente há interação entre genética, fatores hormonais e a exposição à radiação solar, levando à maior melanogênese focal.³⁻⁷

As alterações fenotípicas na pele com melasma decorrem de modificações epidérmicas tanto morfológicas com melanócitos aumentados de tamanho e dendritos proeminentes; quanto disfuncionais, decorrentes da interação entre queratinócitos, alterações da derme superior e os melanócitos.⁸

Há clara relação entre a exposição solar e a piora do melasma, desde a ocorrência exclusiva em áreas fotoexpostas, prevalência em profissionais que se expõem ao sol e melhor resposta terapêutica associada à fotoproteção.^{9,10} Mesmo com evidências do papel da radiação solar na história clínica da doença, não se conhece o padrão de resposta individualizada do melasma em comparação com a pele normal adjacente às diferentes faixas de radiação solar (UVB, UVA e luz visível).

O conhecimento das diferentes influências da radiação solar na melanogênese do melasma pode levar a melhor conhecimento da fisiopatologia da doença, assim como à elaboração de novas opções de tratamento; além de otimizar as estratégias de fotoproteção.

Este estudo objetivou determinar a resposta melanogênica do melasma facial em comparação com a pele normal adjacente após irradiação com UVA, UVB ou luz visível (LV), em modelo *ex vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo *quasi-experimental ex vivo*, envolvendo fragmentos de pele de 22 portadores de melasma facial, diagnosticados por dermatologista titulado. Os participantes foram selecionados entre os pacientes do serviço de dermatologia do HC-Unesp (Botucatu-SP, Brasil), entre setembro/2018 e janeiro/2019. O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa (no. 2.700.889) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento antes da inclusão (Anexo 8.1 e 8.2).

Foram elegíveis para o estudo pacientes adultos (>18 anos), de ambos os sexos, entre os fototipos III a V; sem tratamento para melasma, exceto filtro solar por, no mínimo, 30 dias. A restrição aos fototipos baseou-se no fato de que os fototipos I e II representam menos de 10% dos casos de melasma e não apresentam melanogênese satisfatória após irradiação experimental.^{3,11}

Não foram incluídos no estudo os portadores de outras dermatoses faciais, dermatoses com fotossensibilidade, colagenoses, discrasias sanguíneas, sob uso de medicação anticoagulante, imunossuprimidos, gestantes e lactantes. A amostragem foi realizada por conveniência, utilizando pacientes consecutivos, concordantes, durante consultas médicas na instituição.

A coleta de material ocorreu de forma padronizada e sob procedimento estéril. Duas amostras foram coletadas: pele com melasma e pele normal adjacente, distantes até 2 cm entre si, sob anestesia local infiltrativa com lidocaína 2% com vasoconstritor. A remoção contemplou até a derme reticular, com *punch* 3 mm e sutura com fio mononylon 6.0. Foram privilegiadas áreas periféricas da face a fim de minimizar cicatrizes inestéticas.

As amostras foram seccionadas longitudinalmente em duas partes e armazenadas em 10 mL do meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, high glucose – D5796, Sigma Inc, UK) em frasco plástico transparente estéril, segundo protocolo estabelecido por Olivatti em temperatura ambiente.¹² Uma parte foi acondicionada imediatamente ao abrigo da luz, enquanto a outra foi exposta à radiação (efetiva no tecido) UVB, UVA e LV: 166 mJ/cm², 1,524 J/cm² e 40 J/cm² (componente luz azul-violeta). Os fragmentos foram irradiados a partir de fontes artificiais de UVB (230µW/cm²; fonte FS72T12/UVB/HO), UVA (1270 µW/cm²; fonte Phillips TL 100W/10R) e luz LED (110 mW/cm² na faixa azul-violeta; fonte GBRLUX 200W), com distância padronizada de 10cm. A absorbância dos frascos plásticos foi de cerca de 50% para todas as radiações.

Após a irradiação, ambos os fragmentos (irradiados e não irradiados) foram cultivados ao abrigo da luz. Passadas 72 h, as amostras foram retiradas do meio de cultura e mantidas em formol 10% tamponado por 36 h. Posteriormente, foram desidratadas em álcool 70% por, no mínimo, 12 h antes da fixação em parafina e coloração com Fontana-Masson (FM).

Para estimar a melanização dos fragmentos, capturaram-se quatro fotografias de áreas centrais e interfoliculares das amostras, corados pelo FM, privilegiaram-se áreas *hotspot*, e as imagens foram salvas em formato jpg (1264x681 pixels). Todo o processo de captura e análise ocorreu de maneira cega quanto à topografia ou tipo e regime de irradiação.

As imagens selecionadas foram analisadas no programa ImageJ 1.43, a partir da seleção manual da camada basal, seguida pela limiarização a partir do canal “red” (Anexo 3).¹³

O principal desfecho do estudo foi o percentual de melanização da camada basal, comparado entre os grupos (melasma vs. pele normal adjacente) e entre as radiações (UVB vs. UVA vs. LV). Foram também avaliados o percentual de melanina na derme superficial, presença de dendritos e granulações grosseiras dos melanossomas (ausente, presente e proeminente) nas áreas amostradas.

O valor médio do percentual de melanina da camada basal, da derme superficial e os escores dos dendritos e granulação foram tabulados para cada espécime. Os grupos de comparação foram avaliados segundo modelo linear generalizado de efeitos mistos, ajustados pelo fototipo, com matriz de covariância robusta, estrutura autoregressiva (AR1), e *post-hoc* de Sidak.¹⁴

A amostra foi dimensionada após pré-teste com a dosimetria de radiação que levava à expectativa de aumento de 10% no percentual de melanização na camada basal avaliada por análise de imagem digital das lâminas coradas pelo FM, considerando alfa 5% e poder de 20%.¹⁵

Os dados foram tabulados em MsExcel 2013, analisados no IBM SPSS 25. Considerou-se significativo p-valor <0,05 bicaudal.

RESULTADOS

Foram avaliados 89 fragmentos de pele de 22 portadores de melasma facial (um participante voluntariou-se para a coleta de 4 amostras com o intuito de testar todas as irradiações). A idade média (desvio-padrão) dos participantes foi 42,1 (10,4) anos, 21 eram do sexo feminino, quanto aos fototipos: III (46%), IV (27%) e V (27%). Houve contaminação em três fragmentos de cultura (UVA pele normal adjacente pré-irradiação; UVB pele do melasma pós-irradiação, UVB pele normal adjacente pós-irradiação), que não foram incluídos na análise dos resultados.

Os pacientes cujas amostras foram submetidas à irradiação UVB, UVA e LV apresentavam fototipos: III (33% vs. 37% vs. 0%), IV (44% vs. 37% vs. 71%) e V (22% vs. 25% vs. 28%) ($p=0,35$).

Houve melanogênese (Figuras 1-4) no melasma e na pele normal adjacente após todas as irradiações ($p<0,01$): mediana de incremento UVB (4,7% vs. 8,5%), UVA (9,5% vs. 9,9%) e LV (6,8% vs. 11,7%) (Figuras 1-3), sem diferença entre as topografias ($p=0,66$).

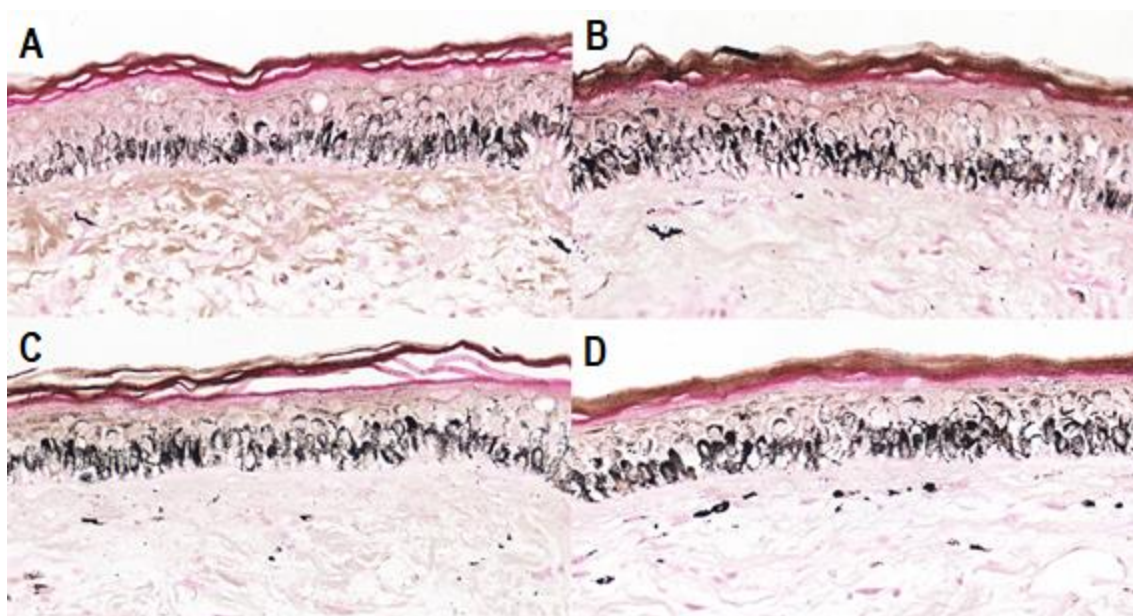


Figura 1. Fragmentos histológicos de pele corados pelo Fontana-Masson de melasma facial e pele normal adjacente antes e após irradiação com 166 mJ/cm² UVB, revelando aumento da densidade de melanina basal entre as amostras. (A): pele normal adjacente pré irradiação UVB; (B): pele normal adjacente pós-irradiação UVB; (C): pele com melasma pré-irradiação UVB; (D): pele com melasma pós-irradiação com UVB.

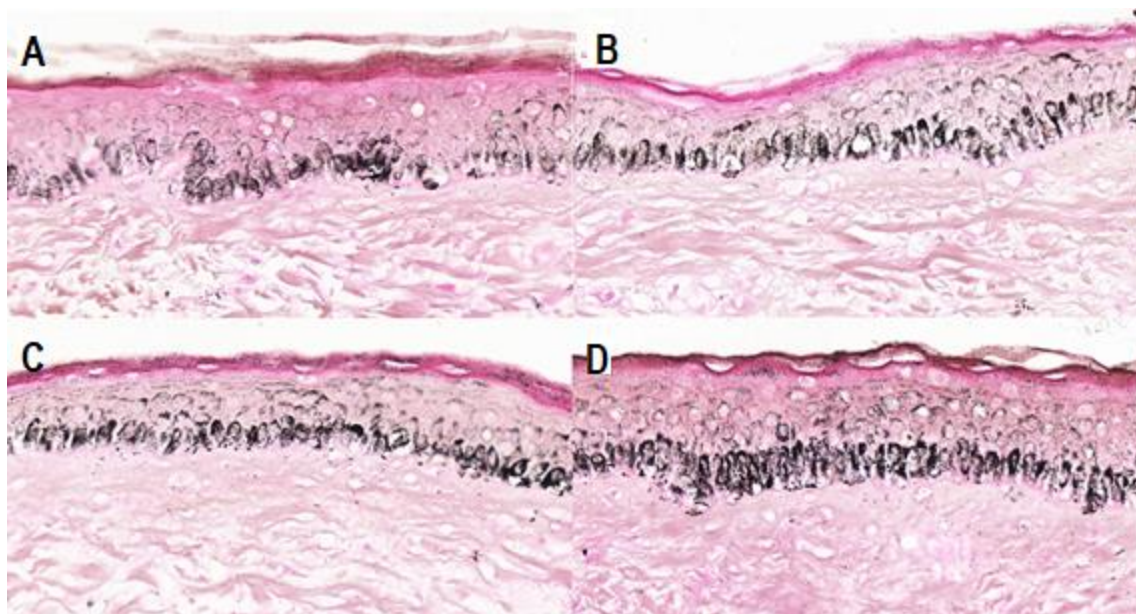


Figura 2. Fragmentos histológicos de pele corados pelo Fontana-Masson de melasma facial e pele normal adjacente antes e após irradiação com $1,524 \text{ J/cm}^2$ UVA, revelando aumento da densidade de melanina basal entre as amostras. (A): pele normal adjacente pré irradiação UVA; (B): pele normal adjacente pós-irradiação UVA; (C): pele com melasma pré-irradiação UVA; (D): pele com melasma pós-irradiação com UVA.

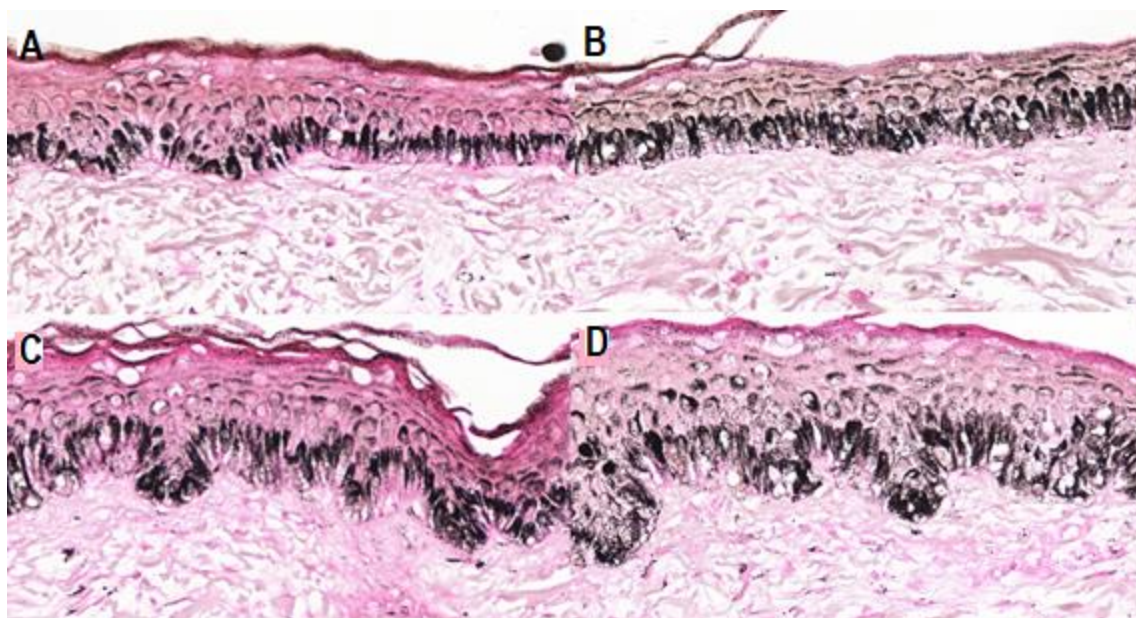


Figura 3. Fragmentos histológicos de pele corados pelo Fontana-Masson de melasma facial e pele normal adjacente antes e após irradiação com 40 J/cm^2 luz visível, revelando aumento da densidade de melanina basal entre as amostras. (A): pele normal adjacente pré irradiação LV; (B): pele normal adjacente pós-irradiação LV; (C): pele com melasma pré-irradiação LV; (D): pele com melasma pós-irradiação com LV.

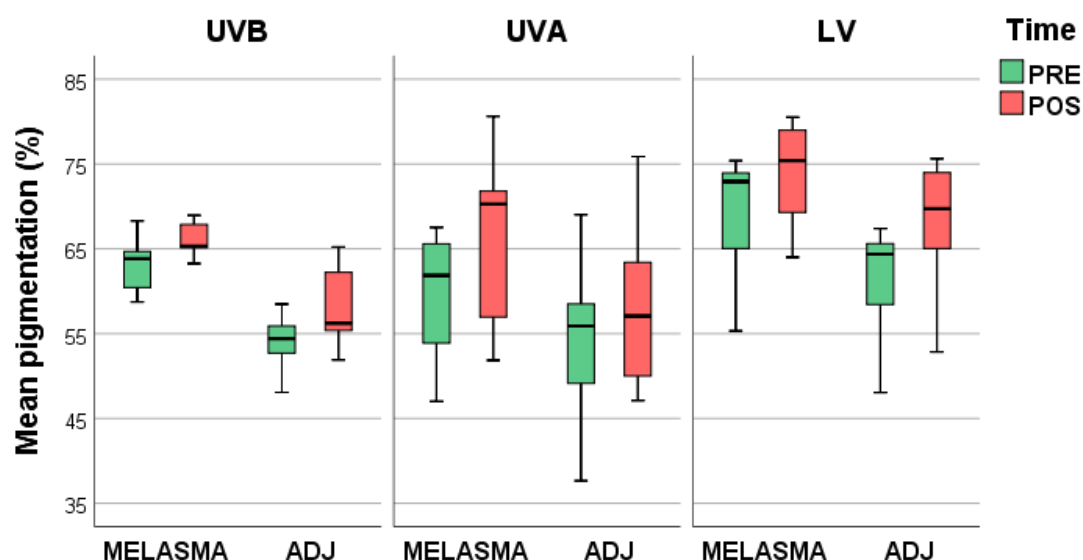


Figura 4. Percentual de melanina da camada basal das culturas dos fragmentos de melasma e pele adjacente (ADJ), antes e após (PRE e POS) irradiação com UVB, UVA e luz visível (LV). $p < 0,01$: Comparação pré versus pós irradiação para todas as topografias e irradiações; $p = 0,66$: Comparação entre as topografias.

Quando ajustado para o fototipo, houve aumento do percentual de melanina na derme superior de ambas as topografias nas amostras irradiadas para UVB ($p = 0,03$): melasma (0,49% para 0,67%), pele normal adjacente (0,57% para 0,75%). Entretanto, a irradiação com UVA promoveu aumento da melanina na derme apenas para o melasma ($p = 0,047$): 0,55% para 0,83%; sem diferença para a LV.

Houve também, aumento de 2,16 vezes na granulação da melanina (melanossomas mais grosseiros) somente após a irradiação com UVA, e apenas na pele com melasma ($p < 0,01$). Entretanto, a maior proeminência dos dendritos ocorreu apenas na pele com melasma para irradiação com UVB (1,49 vezes), e para LV (2,02 vezes; $p < 0,01$), sem diferença entre UVB e LV.

DISCUSSÃO

Houve efetiva melanogênese epidérmica nas culturas de pele submetidas à UVB, UVA e LV, sem diferença quantitativa entre as topografias, subsidiando a importância da fotoproteção de amplo espectro no tratamento de dermatoses pigmentares, como o melasma.¹⁶

As doses de radiação testadas, apesar de independentes, equivaleram a cerca de 6-12 minutos de exposição solar ao meio-dia, no verão, no interior do Brasil (Latitude: 22° 53' 09" S; Longitude: 48° 26' 42" W; Altitude: 804m), dia sem nuvens, medida em 09-dez-2018 pelos pesquisadores. Entretanto, os níveis de UVA e LV solares alcançam um platô de energia com duração entre 9h até as 18h, enquanto o UVB apresenta seu pico entre 11h e 15h, tanto no verão, quanto no inverno. Isso justifica o relato de piora do melasma após breves exposições desprotegidas fora do horário de pico de UVB, ou mesmo após longas exposições com fotoprotetor (p.ex. engarrafamento no trânsito), visto que não há completo bloqueio das radiações solares pelos filtros solares.¹⁷ Em tempo, as radiações UVB, UVA e LV em ambientes fechados (ex: telas de celular e computadores, lâmpadas fluorescentes) são desprezíveis para efeitos de melanogênese ($<1\text{mJ/cm}^2$).

A LV possui amplo espectro de comprimentos de onda (400 – 700 nm) que não atuam de forma homogênea na pigmentação. Um estudo realizado na França, testou o espectro da luz azul-violeta (400 – 500 nm) em comparação com o espectro da luz vermelha (620-750 nm) e não houve pigmentação induzida pela segunda, justificando a escolha da faixa azul violeta para o estudo.¹⁸

Apenas filtros solares com cor apresentam proteção efetiva contra LV, e, em sua maioria, apresentam também melhor desempenho na proteção UVA. Em levantamento brasileiro com 41 filtros solares opacos, 63% bloquearam $>99,9\%$ de UVA; e apenas 63% bloquearam $>99,9\%$ da luz azul-violeta. Entretanto, tal bloqueio não foi coincidente, já que 31% dos filtros opacos que bloquearam $>99,9\%$ da LV, não tiveram a mesma performance quanto ao UVA.¹⁷ Este estudo é o primeiro a evidenciar o papel da LV na melanogênese de pacientes com melasma facial.

Não ocorreu melanogênese diferencial entre a pele com melasma e normal adjacente, nas doses testadas, o que não exclui a possibilidade que a pele com melasma seja sensível a doses mais baixas de irradiação. A própria maior pigmentação basal do melasma também pode significar um *status* de resistência à melanogênese induzida pela exposição crônica à RUV e LV. Além disso, há maior retenção epidérmica da melanina no melasma, e sua melanogênese depende de diversas outras alterações dérmicas, que favorecem a manutenção da pigmentação, em detrimento da indução melanogênica pela RUV e LV.⁴

A melanogênese ocorre de maneira desigual dependendo do tipo e dose de radiação. O UVA provoca eritema em 4h e pigmentação imediata que evolui com bronzeamento permanente. O UVB causa eritema que persiste por dias a semanas (dependendo do fototipo) e pigmentação

que evolui para bronzeamento. Na LV, o eritema é menos proeminente, ocorre precocemente (2h) e a pigmentação é sustentada com evolução para bronzeamento apenas nos fototipos altos.¹⁹⁻²¹

Toda resposta melanogênica ocorre de forma dose-dependente, sendo, porém, indispensável considerar os fototipos na análise da atuação das diferentes radiações, já que a melanogênese atua de maneira diferente nos fototipos mais altos (III-V), provocando maior pigmentação com evolução para bronzeamento de forma dose-dependente. Diferentemente dos fototipos mais baixos (I-II), em que a irradiação promove menor estímulo. Em estudo experimental, UVA e LV não induziram melanogênese em pacientes com fototipo II.^{11,22}

A melanogênese humana é um processo complexo em que diferentes interações ocorrem de forma organizada para proteção das estruturas cutâneas, além de regulação de ciclos essenciais para a sobrevivência do indivíduo, como o ciclo circadiano. Os melanócitos compõem uma rede com uma leitura própria da luz ambiental respondendo de acordo com os objetivos supracitados.²³

Houve diferentes características na resposta melanogênica entre as topografias e entre as radiações. A formação de dendritos ocorre na fase G2 do crescimento dos melanócitos e representa um importante sinal de resposta melanogênica que foi evidenciada de forma mais proeminente na pele com melasma que na normal adjacente. Apesar da melanogênese ser percebida de forma semelhante em ambas as topografias, a formação de dendritos pode significar maior persistência do fenômeno e maior eficiência na transferência de melanossomas na epiderme.¹¹

A pele com melasma também se caracteriza pela presença de melanossomas mais maduros, equivalentes ao que ocorre em populações mais pigmentadas. Neste experimento, a irradiação UVA promoveu granulação mais evidente que as demais radiações testadas, exclusivamente na pele com melasma, evidenciando que a melanogênese do melasma ocorra de forma mais intensa e assemelhe-se aos fenótipos mais pigmentados. De fato, a miscigenação africana foi associada ao maior risco de melasma em nossa população, e genes ancestrais relacionados à melanogênese podem justificar a resposta pigmentar diferenciada entre as topografias.⁷

O papel da melanina dérmica permanece sem definição clara no melasma, uma das hipóteses é que a disfunção arquitetural da membrana basal e a autofagia dos melanócitos da derme possam ocasionar a presença dos melanófagos dérmicos, semelhante ao ocorrido no

fotoenvelhecimento.²⁴ Neste estudo, UVA e UVB promoveram maior taxa de melanina na derme superior, entretanto, tal densidade é cerca de 100 vezes menor que a epidérmica em ambas as topografias, o que deve contribuir pouco para o fenótipo clínico, mas pode sinalizar alterações subjacentes na derme superior, zona de membrana basal e camada basal.

Finalmente, apesar do papel fundamental da radiação solar no agravamento do melasma, não foram evidenciadas expressões diferenciais de p53 entre a pele com melasma e normal adjacente, sugerindo que a manutenção da melanogênese possa se dever a alterações subjacentes da derme superior e da epiderme, que induzem a hiperfunção melanocítica.⁴ Ademais, o uso exclusivo de filtro solar apesar de efeito preventivo, não é suficiente para a completa remissão do quadro, o que significa a necessidade de contínuo estudo fisiopatológico em busca de tratamentos que levem à reversão de todo o processo.⁹

O presente estudo promoveu uma análise preliminar dos efeitos independentes das radiações UVB, UVA e LV, novas investigações devem ser conduzidas a fim de elucidar o efeito de combinações e dosagens de irradiações que espelhem as condições ambientais. A interação entre o UVA e LV ainda é desconhecida, acredita-se que interajam no mesmo precursor de melanina durante a melanogênese. Esta associação, provavelmente resulta em um comportamento mais evidente da melanogênese em situações naturais, onde LV e UVA expressam-se conjuntamente.²⁰

Este estudo apresenta limitações inerentes à técnica com modelo *ex vivo*, podendo sofrer alterações quanto às diferentes condições de coleta e armazenamento. Entretanto, não impediu a identificação de resposta melanogênica. Outra limitação pode ser apontada pelo fato das irradiações das culturas ocorrerem com comprimentos de onda independentes (UVB, UVA e LV), o que não ocorre na exposição ambiental. Além dos fatores acima apresentados, a cultura está dissociada do organismo, limitando a interação entre os sistemas hormonal, neural e vasomotor.

Novas experimentações devem considerar modelos de irradiações repetidas de baixa intensidade, assim como associadas entre si, para reproduzir a exposição cotidiana dos pacientes. Além disso, pode-se testar a inclusão de ativos como ácido tranexâmico e antioxidantes na prevenção da melanogênese no melasma.

CONCLUSÃO

Houve resposta melanogênica epidérmica tanto na pele com melasma como na pele normal adjacente induzida por UVB, UVA ou LV. Os padrões morfológicos relacionados à

fotobiologia da melanogênese sugerem que diferentes radiações promovam respostas individualizadas na pele com melasma.

Agradecimentos: Ao departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, que apoiou e permitiu que o estudo ocorresse. A FUNADERM que financiou o trabalho.

Referências

1. Miot LDB, Da Silva MG, Miot HA, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol*. 2007;82(6):529-534.
2. Miot HA, Penna G de O, Ramos AMC, et al. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). *An Bras Dermatol*. 2018;93(6):916-928.
3. Tamega ADA, Miot LDB, Bonfietti C, Gige TC, Marques MEA, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2013;27(2):151-156.
4. Espósito ACC, Brianezi G, de Souza NP, Miot LDB, Marques MEA, Miot HA. Exploring pathways for sustained melanogenesis in facial melasma: an immunofluorescence study. *Int J Cosmet Sci*. 2018;40(4):420-424.
5. Miot LDB, Miot HA, Da Silva MG, Marques MEA. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol*. 2009;623-635.
6. Holmo NF, Ramos GB, Salomão H, et al. Complex segregation analysis of facial melasma in Brazil: evidence for a genetic susceptibility with a dominant pattern of segregation. *Arch Dermatol Res*. 2018;310(10):827-831.
7. D'Elia MPB, Brandão MC, de Andrade Ramos BR, et al. African ancestry is associated with facial melasma in women: A cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):1-7.
8. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, et al. Melasma: Histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol*. 2002;146(2):228-237.
9. Lakhdar H, Zouhair K, Khadir K, et al. Evaluation of the effectiveness of a broad-spectrum sunscreen in the prevention of chloasma in pregnant women. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2007;21(6):738-742.
10. Boukari F, Jourdan E, Fontas E, et al. Prevention of melasma relapses with sunscreen combining protection against UV and short wavelengths of visible light: A prospective randomized comparative trial. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(1):189-190.e1.
11. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol*. 2010;130(8):2092-2097.
12. Olivatti T, Alcantara G, Lemos A, Miot H. Standardization of organoid culture for evaluation of melanogenesis induced by UVB, UVA and visible light. *An Bras Dermatol ahead print*.
13. Miot HA, Brianezi G, Tamega A de A, Miot LDB. Techniques of digital image analysis for histological quantification of melanin. *An Bras Dermatol*. 2012;87(4):608-611.
14. Norman G, Streiner D. *Biostatistics. The Bare Essentials*. Third edit.; 2008.
15. Overall JE, Doyle SR. Estimating sample sizes for repeated measurement designs. *Control Clin Trials*. 1994;15(2):100-123.
16. Schalka S, Steiner D, Ravelli FN, et al. Brazilian consensus on photoprotection. *An Bras Dermatol*. 2014;89(6):1-74.
17. Peres G, Miot H. Transmittance of UVB, UVA and visible light (blue-violet) of the main Brazilian commercial opaque sunscreens. *An Bras Dermatol ahead print*.
18. Duteil L, Cardot-Leccia N, Queille-Roussel C, et al. Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: A clinical and histological study in comparison with UVB exposure.

- Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(5):822-826.
19. Kohli I, Chaowattanapanit S, Mohammad TF, et al. Synergistic effects of long-wavelength ultraviolet A1 and visible light on pigmentation and erythema. *Br J Dermatol.* 2018;178(5):1173-1180.
 20. Ramasubramaniam R, Roy A, Sharma B, Nagalakshmi S. Are there mechanistic differences between ultraviolet and visible radiation induced skin pigmentation? *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(12):1887-1893.
 21. Randhawa M, Seo IS, Liebel F, Southall MD, Kollias N, Ruvolo E. Visible light induces melanogenesis in human skin through a photoadaptive response. *PLoS One.* 2015;10(6):1-14.
 22. Miller SA, Coelho SG, Zmudzka BZ, et al. Dynamics of pigmentation induction by repeated ultraviolet exposures: Dose, dose interval and ultraviolet spectrum dependence. *Br J Dermatol.* 2008;159(4):921-930.
 23. Iyengar B. The melanocyte photosensory system in the human skin. *Springerplus.* 2013;2(1):1-18.
 24. Passeron T, Picardo M. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;31(4):461-465.

6. CONCLUSÕES

Foi padronizado um modelo cutâneo *ex vivo* para estudar as diferentes respostas da pele com melasma e da pele normal adjacente à irradiação com diferentes comprimentos de onda (UVA, UVB e luz visível).

Houve resposta melanogênica análoga em modelo *ex vivo* de melasma e na pele normal adjacente induzida por UVB, UVA ou luz visível, com diferenças qualitativas quanto à granulação da melanina, densidade de melanina na derme superior e dendricidade dos melanócitos.

7. ANEXOS

7.1 TCLE 1

RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “PADRONIZAÇÃO DE CULTURA ORGANOIDE CUTÂNEA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA MELANOGÊNICA NO MELASMA AO UVB, UVA E LUZ VISÍVEL”, que será desenvolvido por mim, Hélio Amante Miot, dermatologista da FMB-Unesp. Estou estudando uma doença chamada melasma. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso coletar um fragmento de pele de trás da sua orelha. O risco com a coleta será a picadinha da agulha de anestesia e uma marquinha de cicatriz que fica invisível atrás da orelha. Informo que o material colhido do Senhor(a) será usado em sua totalidade na testagem de uma cultura de pele fora do corpo para ser irradiado com radiações parecidas com a do sol. Não haverá benefício em participar da pesquisa, porém, os resultados devem beneficiar outros pacientes, após os pesquisadores terem o conhecimento dos resultados da pesquisa. Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior–Botucatu–São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos: Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome: Hélio Amante Miot

Endereço: Departamento de Dermatologia e Radioterapia, SN, FMB-Unesp, Botucatu-SP

Telefone: 14 38116015

Email: heliomiot@gmail.com

7.2 TCLE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “PADRONIZAÇÃO DE CULTURA ORGANOIDE CUTÂNEA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA MELANOGÊNICA NO MELASMA AO UVB, UVA E LUZ VISÍVEL”, que será desenvolvido por mim Hélio Amante Miot, dermatologista da FMB-Unesp. Estou estudando uma doença chamada melasma. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso coletar dois fragmentos pequenos de pele de região pré-estabelecida com você no seu rosto, local menos evidente. O risco com a coleta será a picada quase indolor da agulha de anestesia e uma pequena marca de cicatriz que ficará imperceptível após cicatrização total. Informo que o material colhido do Senhor(a), será usado em sua totalidade na testagem de uma cultura de pele fora do corpo para ser irradiado com radiações parecidas com a do sol. Não haverá benefício específico em participar da pesquisa, porém, os resultados devem beneficiar outros pacientes, e até seu próprio tratamento, após os pesquisadores terem o conhecimento dos resultados da pesquisa. Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 1 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos. Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

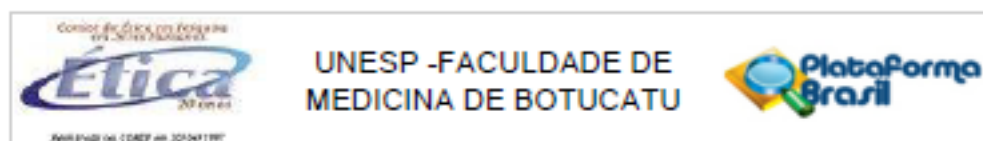
Nome: Hélio Amante Miot

Endereço: Departamento de Dermatologia e Radioterapia, SN, FMB-Unesp, Botucatu - SP

Telefone: 14 38116015

Email: heliomiot@gmail.com

7.3. Aprovação no CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padronização de cultura organóide cutânea e avaliação da resposta melanogênica no melasma ao UVB, UVA e luz visível.

Pesquisador: Hélio Amante Miot

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 90152218.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Dermatologia e Radioterapia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.700.889

Apresentação do Projeto:

O melasma é uma hipermelanose crônica e adquirida resultado de uma hipertrofia melanocítica e disfunção melanogênica. Acomete milhões de indivíduos no mundo todo, na maioria das vezes mulheres no período fértil. As lesões ocorrem em áreas fotoexpostas, sendo a face a região mais prevalente, resultando em impacto significativo na qualidade de vida das pacientes afetadas. A fisiopatologia do melasma ainda é pouco esclarecida, aparentemente a interação entre os fatores hormonais e a exposição à radiação aparenta ser uma das grandes chaves para estabelecer as bases da doença. Sabe-se que há uma relação entre a exposição aos raios UVA e UVB e a piora do quadro, mas pouco se sabe sobre a atuação da luz visível, desta forma o avanço neste campo pode auxiliar na busca de resposta para a elaboração de tratamentos e padronização da fotoproteção.

Este estudo pretende desenvolver e padronizar um modelo de cultura organóide cutâneo a fim de estudar as diferentes reações da pele com melasma e a pele sã adjacente à irradiação com diferentes comprimentos de onda (UVA, UVB, luz visível). O estudo consiste de duas partes, na primeira 10 indivíduos voluntários terão fragmentos da região retroauricular retirados por biópsia com punch 3mm, divididos em duas partes e armazenados no meio específico (Dulbecco, Sigma) para cultura organóide e dosimetria das radiações de melanogênese, sendo uma das amostras irradiada e a outra mantida ao abrigo da luz por 72 horas. Após esse período serão avaliados os aspectos morfológicos e arquiteturais da histologia (H&E) e por rt-PCR será avaliada a expressão quantitativa de genes constitucionais entre as peles recém coletadas e a cultivadas por 72 horas.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

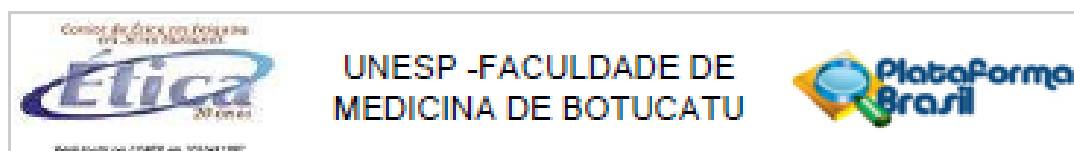
CEP: 18.618-070

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1800

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.700.009

Com a pigmentação melânica induzida pelas radiações, haverá a padronização das doses de cada radiação e avaliação por análise de imagem digital das lâminas coradas pelo Fontana-Masson. Os resultados serão tabulados a fim de obter o menor tempo de cultura e a menor dose para detectar um aumento de 20% na intensidade de pigmentação. Na segunda parte do estudo, será solicitado a 18 indivíduos com melasma facial a retirada de 2 amostras de biópsia (1 de pele sã perilesional e 1 da pele com melasma, distantes não mais que 2 cm) com anestesia local e remoção superficial com punch 3mm. Estas amostras serão acondicionadas em meio de cultura seguindo o protocolo anteriormente padronizado. Os valores das intensidades de pigmentação melânica das 72 amostras serão comparados entre os grupos (UVA x UVB x luz visível), entre os procedimentos (Irradiado x não-irradiado) e entre as topografias (melasma x perilesional) por modelo linear generalizado de efeitos mistos. Espera-se padronizar a cultura organoide de pele, com sobrevivência de 72h, manutenção das propriedades melanogênicas e resposta às diferentes radiações. Com este modelo será possível explorar o papel melanogênico de cada radiação no melasma, em comparação com a pele adjacente, o que fundamentará o desenvolvimento de novas terapêuticas e a padronização da fotoproteção na doença. Além disso, a padronização deste modelo servirá de base para estudos futuros em fotobiologia e regulação da melanogênese.

As biópsias serão realizadas preferencialmente em áreas periféricas da face a fim de minimizar cicatrizes inestéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver e padronizar um modelo de cultura organoide cutâneo para estudar as diferentes respostas da pele com melasma e da pele sã adjacente à irradiação com diferentes comprimentos de onda (UVA, UVB e luz visível).

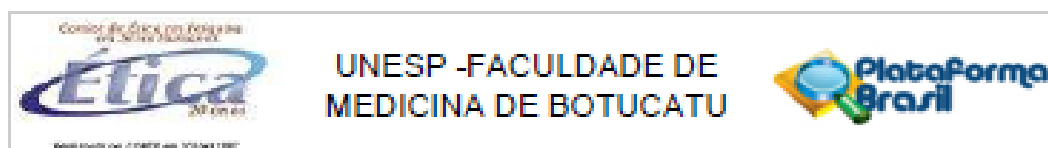
Objetivo específico:

Determinar a resposta melanogênica do melasma em comparação com a pele adjacente após irradiação com UVA, UVB ou luz visível.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos incluem a possibilidade de dor durante a realização do procedimento, discromias, infecção local. Esses riscos estão explicados no TCLE. Os benefícios incluem potencialmente o maior entendimento sobre a fisiopatogênese do melasma, e a padronização de modelo que servirá de base para futuros estudos em fotobiologia e regulação da melanogênese.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.818-070
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1800 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.700.000

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto atende aos requisitos das resoluções de pesquisa em seres humanos, está claro e bem estruturado. O TCLE está adequado, redigido de forma clara e precisa, e descreve todos os procedimentos a que os participantes serão submetidos. Existem um TCLE para o grupo controle e outro para os pacientes. Estima-se a inclusão de 26 participantes de pesquisa.

O cronograma é adequado, com início previsto para junho de 2018 e conclusão em janeiro de 2020. Orçamento estimado em R\$ 2000,00 para gastos do material para as biópsias. O projeto será submetido à FAPESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram folha de rosto e o Termo de Anuência Institucional.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa apresentado encontra-se APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

Atenciosamente,

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-070
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1800 E-mail: cep@fmb.unesp.br

	UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU	
Continuação do Parecer: 2.700.000		

Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1128436.pdf	21/05/2018 16:25:34		Acelto
Outros	TermoDeAnuenciainstitucional.pdf	21/05/2018 16:24:18	Hélio Amante Miot	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/05/2018 21:23:13	Hélio Amante Miot	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	03/05/2018 21:21:16	Hélio Amante Miot	Acelto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	03/05/2018 21:19:46	Hélio Amante Miot	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

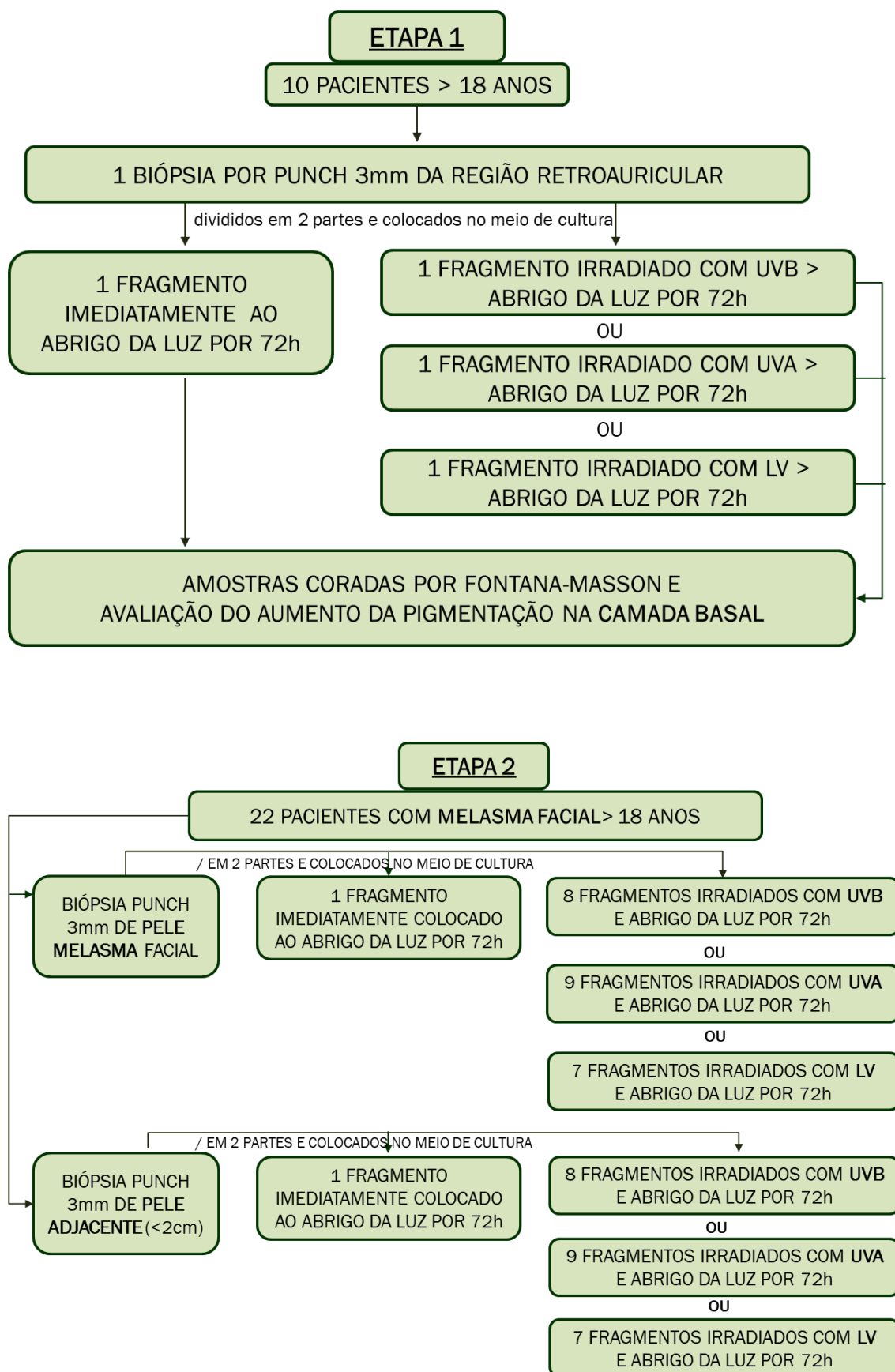
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 08 de Junho de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

7.4. Fluxograma das Etapa 1 e Etapa 2



7.5. Materias e exemplo de irradiação



Frasco estéril transparente
(absorbância 50%)



Meio de cultura DMEM High glicose



Irradiação luz LED a 10cm

7.6. Rotina de segmentação das imagens

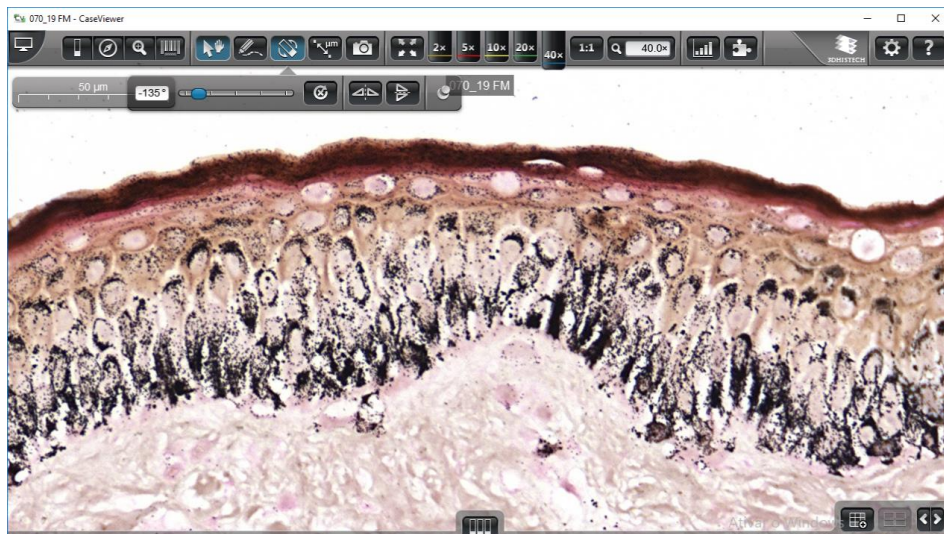


Figura 1. Seleção de áreas *hotspots* das lâminas coradas com FM (CaseViewer com aumento de 40x)

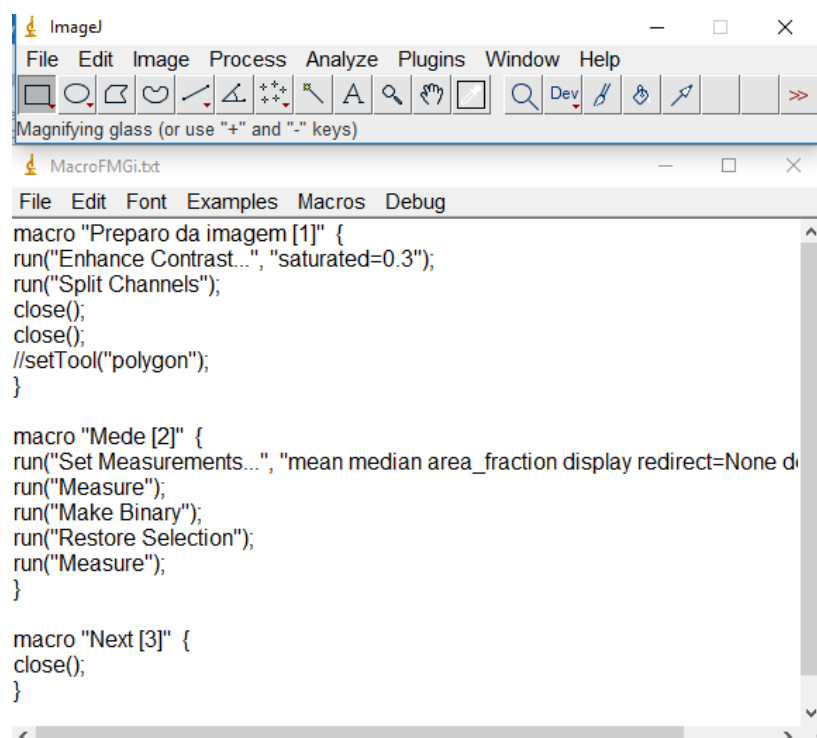


Figura 2. Programa ImageJ para análise das áreas escolhidas e instalação da macro.

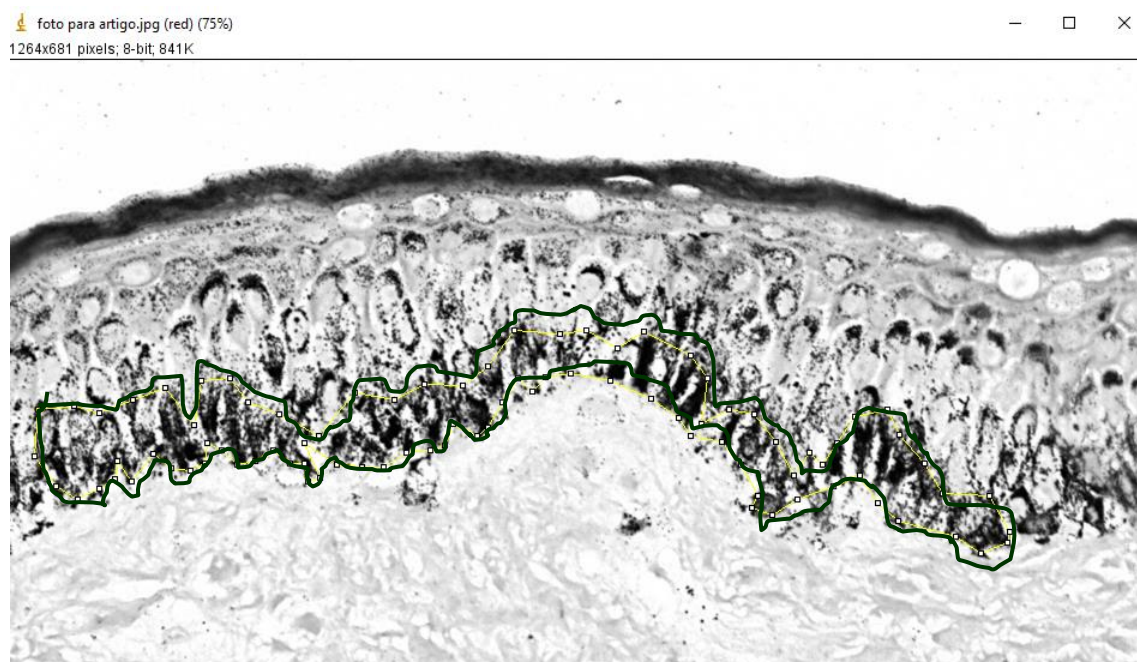


Figura 3. Aplicação da macro na fotografia escolhida e seleção manual da camada basal.

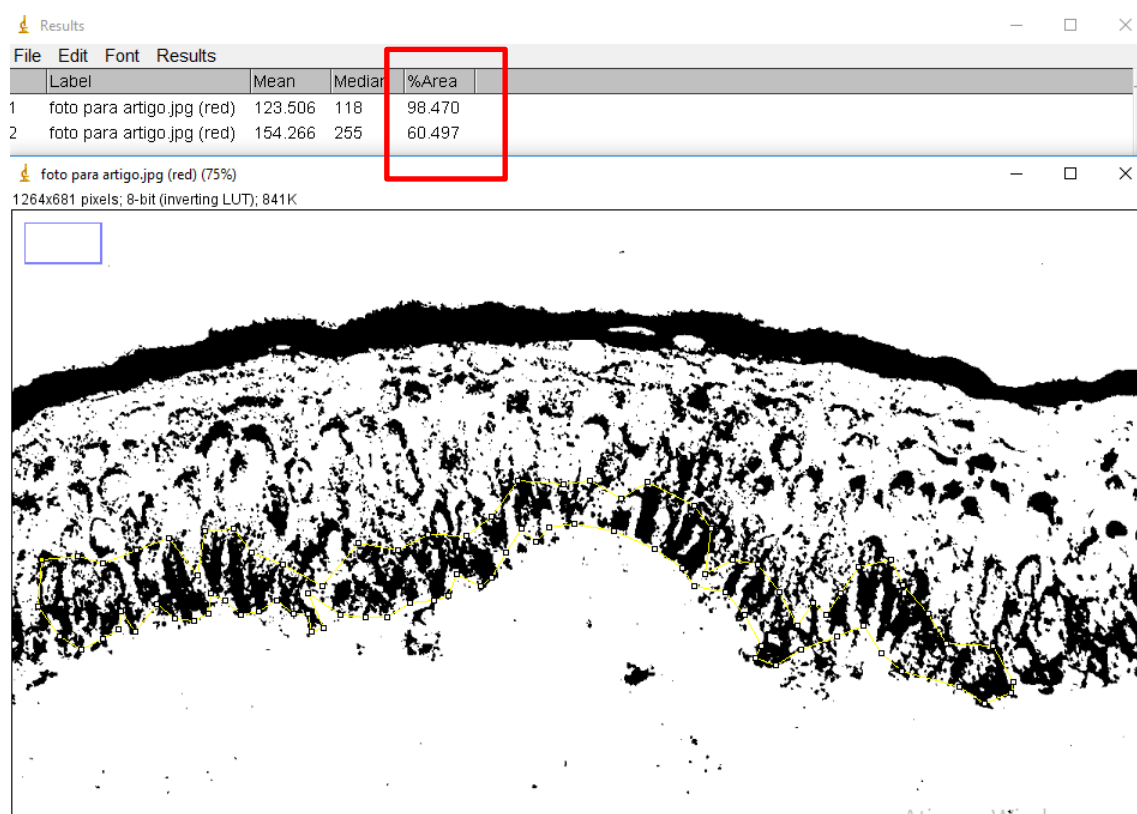


Figura 4. Recorte da camada basal e análise da melanina.

