

Juliana Kida Ikino

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA
PATOGENESE DO MELASMA / ANÁLISE DA QUALIDADE DE
VIDA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ikino, Juliana Kida

Estudo da influência da inflamação na patogênese do melasma / Análise da qualidade de vida / Juliana Kida Ikino ; orientadora, Profa. Dra. Tânia Silvia Fróde - Florianópolis, SC, 2013.

51 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Melasma. 3. Patogênese. 4. Inflamação. 5. Qualidade de Vida. I. Fróde, Profa. Dra. Tânia Silvia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

JULIANA KIDA IKINO

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DO
MELASMA/ANÁLISE DA QUALIDADE DE VIDA**

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para obtenção do título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

E aprovada em 28 de fevereiro de 2013, atendendo as normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração: **Investigação Clínica**.



Prof. Dra. Tânia Silvia Fróde

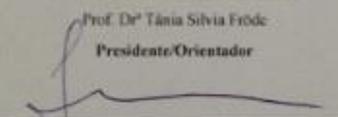
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:



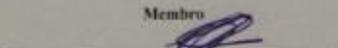
Prof. Dr. Tânia Silvia Fróde

Presidente/Orientador



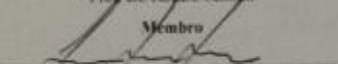
Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira

Membro



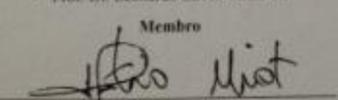
Prof. Dr. Juliano Schmidt

Membro



Prof. Dr. Leonardo Lucca Schiavon

Membro



Prof. Dr. Hélio Arnante Miot

Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me guiou por um caminho de realizações, mesmo que muitas vezes este caminho tenha parecido sinuoso.

Aos meus pais e irmã - que sempre me apoiaram em toda vida acadêmica - minha gratidão.

Ao Cláudio, meu marido, por demonstrar carinho, confiança, paciência, companheirismo e amor, sentimentos tão importantes.

Às minhas filhas Milene e Paula, pelos períodos de ausência.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde, por sua confiança, bem como pela atenção e amizade dispensadas desde o início das minhas atividades.

Aos meus amigos Vanessa Priscila Martins da Silva, Mariana Sens, Daniel Holthausen Nunes e Gabriella Di Giunta, pelo apoio e ajuda durante toda a execução do projeto .

Ao grupo de pesquisa da Profa. Dra Tânia Silvia Fröde, do qual faço e farei parte. Em especial Ziliani, Marina, Julia e Gustavo.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos.

Agradeço a todas as pessoas que me dedicaram seu tempo e esforço, pelas críticas que me ajudaram e certamente ainda ajudarão muito.

Enfim, a todos que fazem parte de minha vida, o meu muito obrigada.

RESUMO

Introdução: O melasma é uma doença de pele caracterizada pelo aparecimento de manchas escuras na face e áreas expostas ao sol e que provocam grande impacto na qualidade de vida. Existem vários fatores envolvidos na sua patogênese, porém os mecanismos que levam ao seu aparecimento ainda não estão totalmente esclarecidos.

Objetivos: Estudar a resposta inflamatória por meio da avaliação da celularidade, presença de edema e de apoptose de queratinócitos nas lesões de melasma, avaliar a presença ou não de telangiectasias, elastose solar e pigmento epidérmico nas lesões de melasma, avaliar a participação do óxido nítrico (NO) nas lesões de melasma, avaliar o impacto na qualidade de vida do melasma utilizando-se o questionário MelasQol já validado para a língua portuguesa.

Métodos: O estudo foi do tipo observacional transversal com componente analítico. A amostra foi definida como de conveniência. Foram selecionados 51 pacientes com diagnóstico clínico de melasma no ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) entre Janeiro de 2011 e Dezembro de 2011. O trabalho envolveu a coleta de dados clínicos e a aplicação do questionário MelasQol em todos os pacientes selecionados e da realização de biópsias de 31 pacientes portadores de melasma. No protocolo foram realizadas 4 biópsias com punch 2 mm, sendo duas amostras obtidas da área de melasma e duas da pele normal adjacente com distância mínima de 1cm entre elas. O primeiro fragmento de cada área foi encaminhado para análise histológica e o segundo para dosagem do óxido nítrico. O óxido nítrico foi quantificado pela formação de seus metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando a reação de Griess.

Resultados: A idade média foi de $38,43 \pm 6,75$ anos, todos os pacientes eram do sexo feminino, e os fototipos mais comuns foram III (49,02%) e IV (33,33%). A idade média no início da doença e a duração da doença foram de $29,18 \pm 7,05$ e $9,25 \pm 6,18$ anos. Na avaliação histológica apresentaram diferença estatística a presença de elastose solar ($P=0,001$) e aumento da pigmentação melânica na epiderme ($P < 0,001$) quando comparadas as amostras da lesão de melasma e as de pele normal. A dosagem de nitrito/nitrato que são metabólitos do NO na pele lesional e perilesional, não mostrou diferença estatística entre os grupos estudados. A análise do MelasQol mostrou que 94,11% dos pacientes

sentem-se incomodados com a aparência de sua pele, 64,71% sentem frustração ou constrangimento pela condição de sua pele, 52,94% sentem-se depressivos e 78,43% têm a sensação de não serem atraentes. Entretanto, para 68,63% dos pacientes, o melasma não afeta as relações com outras pessoas, 86,27% dos pacientes não sentem dificuldade em demonstrar afeto, 66,67% não se sentem menos produtivos e para 74,51% o melasma não afeta seu senso de liberdade.

Conclusão: Nosso estudo demonstrou que no melasma ocorre aumento de elastose e aumento da pigmentação na epiderme. O melasma está implicado também no impacto na qualidade de vida, e nosso estudo demonstrou que o domínio da qualidade de vida mais afetado pelo melasma foi o bem estar emocional e que houve pouco impacto no domínio das relações sociais.

ABSTRACT

Introduction: Melasma is a skin disease characterized by the presence of dark spots on the face and sun-exposed areas. There are several factors involved in its pathogenesis, but the mechanisms that lead to their appearance are not yet fully understood.

Objectives: To study the inflammatory response through the evaluation of cellularity, edema and apoptosis of keratinocytes in the lesions of melasma, assess the presence or absence of telangiectasias, elastosis and epidermal pigment in melasma lesions, assess the involvement of nitric oxide in melasma lesions, assess the impact on quality of life through an already validated to Portuguese language questionnaire (MelasQol).

Methods: This is an observational cross-sectional study with analytical component. The sample was defined as convenience. We selected 51 patients with clinical diagnosis from Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) between January 2011 and December 2011. This study involved the collection of clinical data and the questionnaire MelasQol in all selected patients and biopsies from 31 patients with melasma. In the protocol four biopsies were performed with 2-mm punch, two samples from melasma area and two from adjacent normal skin with minimum distance of 1cm between them. The first fragment area of each was submitted for histological analysis and the second for dosage of nitric oxide. The nitric oxide formation was quantitated by their metabolic nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) using the Griess reaction.

Results: The mean age was 38.43 ± 6.75 years, all patients were female, and the most common skin types were III (49.02%) and IV (33.33%). The mean age at disease onset and disease duration were 29.18 ± 7.05 , 09.25 ± 6.18 years. Histological evaluation showed statistically significance on the presence of solar elastosis ($P = 0.001$) and increased melanin pigmentation of the epidermis ($P < 0.001$) when compared the samples of melasma lesion and normal skin. The dosage of nitrite / nitrate metabolites in lesional and perilesional skin showed no statistical difference between groups. The MelasQol analysis showed that 94.11% of patients feel uncomfortable with the appearance of their skin, 64.71% feel frustration or embarrassment the condition of their skin, 52.94% felt depressed and 78.43% have the feeling of not being attractive. However, for 68.63% of patients, melasma does not affect relations with other people, 86.27% of patients feel no difficulty in showing affection,

66.67% do not feel less productive and 74.51% did not affect their sense of freedom.

Conclusion: Our study demonstrated that in melasma there is an increase in the solar elastosis and it is associated with an increased pigmentation in the epidermis. Melasma is also implicated in the impact on quality of life, and our study showed that the domain of quality of life that was most affected by melasma was emotional wellbeing, and that there was little impact in the domain of social relations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Paciente com melasma (Fonte: Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina).	19
Figura 2 - Fatores que atuam sobre o melanócito (Fonte: www.qimr.edu.au , acesso em Maio/2011).	22
Figura 3 - Mecanismo de ação do óxido nítrico (Fonte: Profa Tania Fröde).	24
Figura 4 - Protocolo para determinação do óxido nítrico.	28
Figura 5 - Total das lâminas avaliadas na histologia.	32
Figura 6 - Cristas epidérmicas mostrando aumento da pigmentação melânica na epiderme na pele com melasma. Coloração Hematoxilina-eosina, aumento 200x.	34
Figura 7 - Presença de melanófagos na derme na pele com melasma. Coloração Hematoxilina-eosina, aumento 400x.	35
Figura 8 - Dosagem das concentrações dos metabólitos de nitrito/nitrato (NOx) nas lesões de pacientes com melasma comparados com o grupo controle (pele normal) obtida do próprio paciente.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e Clínicos de pacientes com melasma.	30
Tabela 2 - Dados demográficos e Clínicos das pacientes submetidas à biópsia.	31
Tabela 3 - Resultados da avaliação da presença de apoptose, edema, telangectasias, elastose, e celularidade na derme de pacientes com melasma.....	33
Tabela 4 - Associação entre avaliação histológica da apoptose, edema, telangiectasias, elastose, e celularidade na derme de pacientes com melasma.....	33
Tabela 5 - Resultados da avaliação histológica da pigmentação da epiderme, melanina livre e melanófagos na derme de pacientes com melasma.....	33
Tabela 6 - Associação entre avaliação histológica da pigmentação da epiderme, melanina livre e melanófagos na derme de pacientes com melasma.....	34
Tabela 7 - Resultados de cada questão do MelasQol (n = 51).....	37
Tabela 8 - Associação de cada questão do MelasQol com idade e duração da doença.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH:	Hormônio adrenocorticotrófico
Akt:	Proteína kinase B
AMPC:	Adenosina fosfato monocíclica
ASP:	Proteína sinalizadora agouti
c-KIT:	Receptor do Stem Cell Factor
CREB:	Proteína ligante do elemento responsivo ao corticóide
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EPR:	Ressonância eletrônica paramagnética
FGF:	Fator de crescimento de fibroblasto
GMPC:	Guanosina monofosfato cíclica
GM-CSF:	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
HE:	Hematoxilina-eosina
HGF:	Fator de crescimento de hepatócito
IL-1 β :	Interleucina 1 β
IL-6:	Interleucina 6
IFN- γ :	Interferon γ
LIF:	Fator inibidor de leucemia
LPS:	Lipopolissacarídeos
MC1R:	Receptor de melanocortina 1
MITF:	Fato de transcrição da microftalmia
α -MSH:	Hormônio estimulador do melanócito α
Nm:	Nanômetro
NO:	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻ :	Nitrito
NO ₃ ⁻ :	Nitrato
NOS:	Óxido nítrico sintase induzida
NOS _n ou NOS I:	Óxido nítrico sintase neuronal ou óxido nítrico sintase I
NOS _i ou NOS II:	Óxido nítrico sintase induzida ou óxido nítrico sintase II
NOS _e ou NOS III:	Óxido nítrico sintase endotelial ou óxido nítrico sintase III
NF κ B:	Fator de transcrição nuclear kappa B
NGF:	Fator de crescimento de nervo
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PGE ₂ :	Prostaglandina E2
PGF ₂ :	Prostaglandina F2

SCF:	Fator Stem Cell
TGF- β 1:	Fator de crescimento transformante β 1
TNF- α :	Fator de necrose tumoral α
M:	Micra
μ M:	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Epidemiologia	20
1.2	Etiopatogenia.....	20
1.3	Melanócito.....	21
1.4	Óxido Nítrico.....	23
1.5	Qualidade de Vida.....	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Primários	25
2.2	Secundários	25
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	26
3.1	Delineamento do estudo	26
3.2	Amostra	26
3.3	Crítérios de inclusão.....	26
3.4	Crítérios de exclusão	27
3.5	Procedimentos para obtenção do material	27
3.6	Análise histológica	27
3.7	Análise quantitativa das concentrações de nitrito/nitrato .	28
3.8	Análise da qualidade de vida.....	29
3.9	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	29
4.1	Dados demográficos e clínicos.....	29
4.2	Avaliação histológica	32
4.3	Dosagem de nitrito/nitrato.....	35
4.4	Qualidade de Vida.....	36
5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÃO.....	41
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	42

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXO 1 - FOTOTIPOS DE FITZPATRICK.....	48
	ANEXO 2 - COMITÊ DE ÉTICA	49
	ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO	50
	ANEXO 4 - MelasQol- Questionário	51

1 INTRODUÇÃO

O melasma é uma doença de pele caracterizada pelo aparecimento de máculas hiperocrômicas, irregulares, bem delimitadas, nas áreas expostas ao sol, principalmente na face, podendo ocorrer também no pescoço, tórax anterior e membros superiores (1) (Figura 1). Melasma é uma palavra derivada do grego “*melas*”, que significa negro; também denominada de Cloasma, derivada do grego “*cloazein*” que significa esverdeado, sendo esse último termo pouco utilizado atualmente.



Figura 1 - Paciente com melasma (Fonte: Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina).

1.1 Epidemiologia

O melasma é mais comum em hispânicos, asiáticos e latinos que vivem em áreas com alta exposição à radiação ultravioleta (2,3). No Brasil, a exata prevalência não é conhecida. Em estudo por meio de questionário realizado com 932 dermatologistas brasileiros, as manchas de pele foram responsáveis por 8,4% das consultas (4). Outro estudo epidemiológico com 1500 pessoas em 11 cidades brasileiras demonstrou que 19,2% têm ou já tiveram manchas na pele (5). Em pesquisa realizada com mulheres grávidas a prevalência de melasma foi de 10,7% no Rio Grande do Sul (6). O melasma é mais comum em mulheres, entre 30-55 anos, no entanto pode ocorrer em todas as raças, sendo mais frequente nos fototipos IV a VI (7, 8) (Anexo 1).

1.2 Etiopatogenia

A etiopatogenia do melasma ainda não está totalmente esclarecida. Vários são os fatores envolvidos no seu aparecimento como radiação ultravioleta, predisposição genética, gravidez, uso de anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal, cosméticos e medicações anticonvulsivantes (9).

Histologicamente a maior parte dos estudos demonstraram na pele com melasma aumento da melanina na epiderme, mas número normal de melanócitos (10-12). Entretanto, os estudos são controversos, uma vez que Kang et al (2002) encontraram aumento no número de melanócitos em 84% dos pacientes com melasma num estudo com 56 pacientes coreanas (13). Grimes et al (2005) descreveram na derme discreta elastose solar e infiltrado linfo-histiocítico (9), dados também observados nas biópsias dos pacientes avaliados por Barrera-Hernandez et al (2008), que demonstraram além da elastose solar e do infiltrado linfo-histiocítico, um aumento no número de mastócitos (11). Apesar do número normal de melanócitos encontrados na pele de pacientes com melasma, os estudos de Grimes et al (2005) e Miot et al (2010), observaram melanócitos maiores, mais dendríticos e com mais melanossomas (9, 10).

Os fatores responsáveis por essas alterações no melasma ainda precisam ser esclarecidos. Muitos autores têm estudado o papel de mediadores pró-inflamatórios no melasma. Kang et al (2006) demonstraram que o fator Stem Cell (SCF) e seu receptor c-kit têm sua expressão aumentada na pele de pacientes com melasma em comparação com a pele normal (13). Bak et al (2009) descreveram ainda o aumento na expressão do receptor do fator de crescimento de nervo (NGF) e da

endopeptidase neural na pele de pacientes com melasma (14). Im et al (2002) relataram aumento da expressão do hormônio estimulador de melanócito- α (α -MSH) na pele de pacientes com melasma (15), resultado corroborado por Miot et al (2010) que evidenciaram aumento da expressão de α -MSH e do receptor de melanocortina-1 (MC1R) na pele de pacientes com melasma (10).

Dong et al (2010) demonstraram que o óxido nítrico aumenta a sensibilidade dos melanócitos ao α -MSH aumentando a expressão do receptor MC1R (16). Jo et al (2009) já haviam demonstrado o aumento na expressão da óxido nítrico sintase induzida (NOSi) e a fosforilação de proteína quinase B (Akt) nos queratinócitos da membrana basal da epiderme na pele com melasma (17).

O estudo do papel dos mediadores pró-inflamatórios no melasma parece ser o caminho para esclarecer a etiopatogenia dessa doença tão comum em nosso meio.

1.3 Melanócito

Os melanócitos são células dendríticas derivadas da crista neural, sintetizadoras de melanina. Estas células estão presentes na pele, no folículo piloso, na coróide, na retina dos olhos, na estria vascular da orelha interna, nas leptomeninges e nas membranas mucosas (18). Na pele, os melanócitos estão presentes na camada basal da epiderme e por meio de seus dendritos se comunicam com os queratinócitos, formando a unidade epidermo-melânica. Os melanócitos sintetizam a melanina no interior de organelas de seu citoplasma, os melanosomas, que são transferidos para os queratinócitos por meio de seus dendritos. A melanina é o pigmento responsável pela cor da pele e pela proteção à radiação ultravioleta (19).

O principal receptor que regula a função do melanócito é o receptor de melanocortina-1 (MC1R). A ativação deste receptor promove a produção de adenosina fosfato monocíclica (AMPc), e a fosforilação do fator de transcrição da proteína ligante do elemento responsivo ao corticóide (CREB). A transcrição do CREB ativa vários genes, entre eles o fator de transcrição da microftalmia (MITF), que regula a função do melanócito (20, 21) (Figura 2). O hormônio estimulador de melanócito- α (α -MSH) e o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) são agonistas do MC1R. O único antagonista conhecido do MC1R é a proteína sinalizadora agouti (ASP) (22). Diversos fatores secretados pelos queratinócitos atuam sobre o melanócito: fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de

crescimento celular stem-cell (SCF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento de nervo (NGF), α -MSH, ACTH, endorfina, endotelina-1, prostaglandina E2 (PGE2) e prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), fator inibidor de leucemia (LIF) (23) e óxido nítrico (NO) (24). Os fatores secretados pelos fibroblastos também atuam sobre o melanócito. Dentre eles destacam-se: Dickkopf 1 (25), fator de crescimento transformante β -1 (TGF- β 1), além de FGF, HGF e SCF que também são secretados pelos queratinócitos (22).

Outro fator que atua sobre o melanócito, derivado das células endoteliais e queratinócitos, é o óxido nítrico (26). O trabalho publicado por Dong et al (2010) demonstrou que o óxido nítrico aumenta o número de receptores MC1R em cultura de melanócitos de pele de alpacas (*Vicugna pacos*) estimuladas por radiação ultravioleta (16).

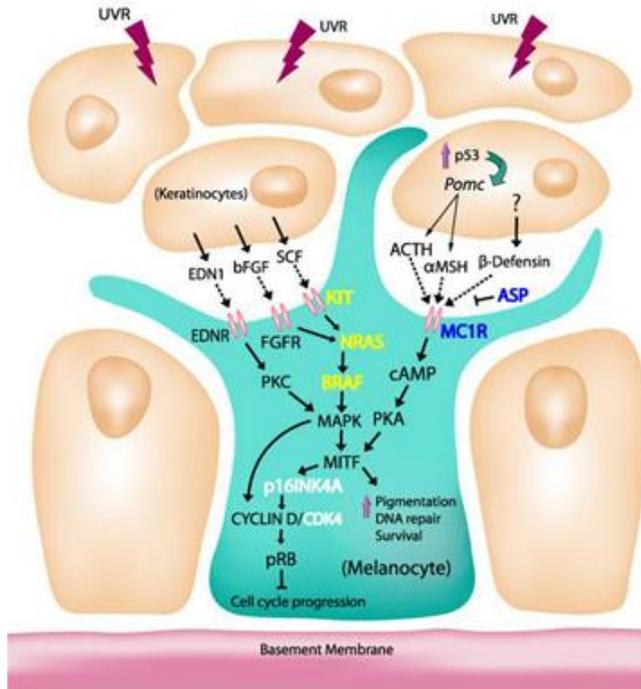


Figura 2 - Fatores que atuam sobre o melanócito (Fonte: www.qimr.edu.au, acesso em Maio/2011).

1.4 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (27).

Atualmente são descritas três isoformas de NOS: NOS neuronal (NOS_n ou NOS I), NOS endotelial (NOS_e ou NOS III), ambas formas são constitutivas, ativadas fisiologicamente mantendo baixas concentrações de óxido nítrico e são dependentes de cálcio. Já, a NOS induzida (NOS_i ou NOS II) é ativada em resposta a diversos estímulos (27). A expressão de NOS_i é regulada via fator de transcrição nuclear, dentre eles cita-se o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (28). Esta enzima pode ser induzida em células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por lipossacarídeos (LPS), citocinas (Interleucina-1β, fator de necrose tumoral α, Interferon-γ, Interleucina-6), entre outros (29, 30) (Figura 3).

Em condições fisiológicas, o óxido nítrico está envolvido no relaxamento vascular, na inibição da agregação plaquetária, na neurotransmissão e nas atividades antimicrobiana e anti-tumoral dos macrófagos. Entretanto, em condições patológicas alguns metabólitos do óxido nítrico podem ser citotóxicos, como o peroxinitrito e os nitrosotióis. Estes metabólitos são capazes de lesar o ácido desoxirribonucléico (DNA), os lipídeos microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças auto-imunes (30).

Na pele, o óxido nítrico é produzido pelas células endoteliais, melanócitos e queratinócitos. A óxido nítrico sintase induzida é expressa pelos melanócitos em resposta ao TNF-α, IFN-γ, LPS e radiação ultravioleta (31, 32). Tsatmali e cols (2000) observaram que o hormônio α-MSH modula a produção de óxido nítrico pelos melanócitos (31), já Dong e cols (2010) demonstraram recentemente que o óxido nítrico aumenta a sensibilidade dos melanócitos ao α-MSH aumentando a expressão do receptor MC1R (16).

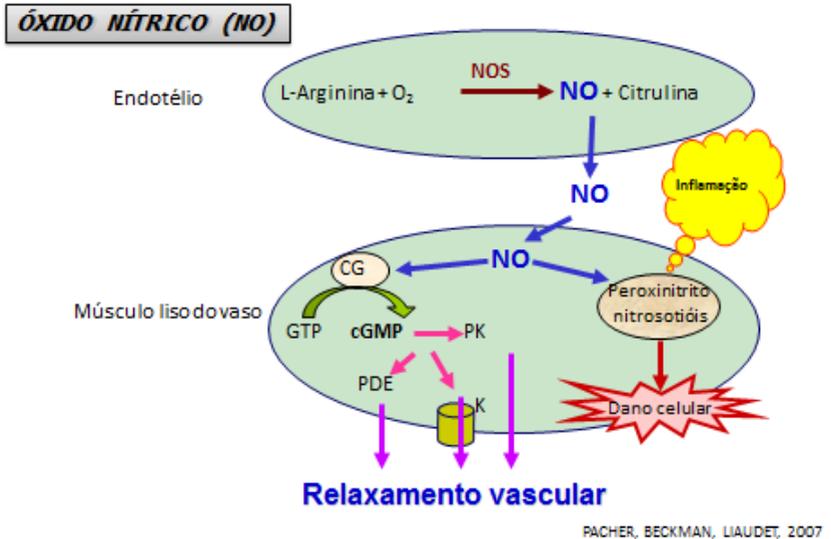


Figura 3 - Mecanismo de ação do óxido nítrico (Fonte: Profa Tania Fröde).

Uma vez que o melasma tem um impacto importante na aparência física do indivíduo, e este fato pode comprometer o estado emocional, é importante comentarmos sobre a qualidade de vida dos pacientes com melasma.

1.5 Qualidade de Vida

A qualidade de vida é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a percepção do indivíduo de sua posição na vida no contexto da cultura e valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações (33). É um conceito amplo multidimensional que geralmente inclui avaliações subjetivas de ambos os aspectos positivos e negativos de vida. O que torna um desafio para quantificá-la é que, embora a "qualidade de vida" tenha significado para quase todos, indivíduos e grupos podem defini-lo de forma diferente. Embora a saúde seja um dos domínios mais importantes da qualidade de vida global, existem outros domínios como, por exemplo, emprego, habitação, escolas, vizinhança. Aspectos da cultura, valores e espiritualidade são também aspectos importantes da qualidade de vida que contribuem para a complexidade da sua medição (34). A medida da qualidade de vida é muito importante na dermatologia, pois as doenças

de pele tem grande impacto na aparência física e no estado emocional do paciente.

Em 2003, Balkrishnan et al publicaram um novo instrumento para quantificar a qualidade de vida relacionada a saúde para pacientes com melasma, denominado de MelasQol (35). O MelasQol é um questionário com 10 questões relacionadas ao impacto do melasma no estado emocional, relações sociais e atividades diárias. O MelasQol já foi traduzido e validado para as línguas espanhola, portuguesa, francesa e turca (36- 39).

Diversos estudos já demonstraram que o melasma promove impacto importante na qualidade de vida dos pacientes acometidos. No Brasil, Cestari et al (2006) aplicaram o MelasQol em 300 pacientes com melasma e observaram que 65% deles sentiam-se incomodados, 55% sentiam-se frustrados e 57% sentiam-se constrangidos pela condição de sua pele, na maioria das vezes ou durante todo o tempo (37).

2 OBJETIVOS

2.1 Primários

- 2.1.1 Estudar o envolvimento da resposta inflamatória na fisiopatogenia do melasma;
- 2.1.2 Avaliar a qualidade de vida dos pacientes com melasma.

2.2 Secundários

- 2.2.1 Estudar a resposta inflamatória por meio da avaliação dos tipos celulares, presença de edema e de apoptose de queratinócitos nas lesões de melasma;
- 2.2.2 Avaliar a presença ou não de telangiectasias, elastose solar e pigmento melânico epidérmico nas lesões de melasma;
- 2.2.3 Avaliar a participação do óxido nítrico nas lesões de melasma;
- 2.2.4 Avaliar a qualidade de vida através do questionário MelasQol.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Estudo clínico do tipo observacional transversal com componente analítico.

3.2 Amostra

A amostra foi definida como de conveniência. Neste protocolo foram selecionados 51 pacientes com diagnóstico clínico de melasma no ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina entre Janeiro de 2011 e Dezembro de 2011.

O trabalho envolveu a coleta de dados clínicos, a aplicação do questionário MelasQol a todos os pacientes selecionados e a realização de biópsias de 31 pacientes portadores de melasma. As biópsias foram realizadas somente nos pacientes que concordaram com a realização da mesma.

O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o nº 1802/11 (Anexo 1) e está de acordo com as normas preconizadas com a Declaração de Helsinki e pelas diretrizes da Associação Médica Mundial (World Medical Association) (40).

3.3 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram:

- Pacientes com diagnóstico clínico de melasma;
- Pacientes alfabetizados, capazes de ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e compreender os objetivos do estudo;
- Pacientes que permitiram a utilização de seus dados para as atividades de pesquisa a partir da assinatura de suas fichas clínicas pelos mesmos ou por um familiar responsável. Neste caso o paciente ou responsável assinou o *termo de consentimento livre e esclarecido* que foi lido, pelo médico responsável, de forma detalhada no primeiro dia de entrevista do paciente. (Anexo 2)

3.4 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- Paciente ter se recusado ou desistido de participar deste projeto de pesquisa;
- Pacientes que fizeram uso de corticóide tópico na pele acometida por melasma, até 3 meses antes da consulta inicial;
- Pacientes que apresentaram queimadura solar grau 1 a 3, até 3 meses antes da consulta inicial;
- Pacientes em uso de anti-inflamatórios hormonais ou não hormonais ou imunossupressores;
- Pacientes com doenças inflamatórias e/ou auto-imunes;
- Pacientes grávidas.

3.5 Procedimentos para obtenção do material

Foram realizadas 4 biópsias com punch 2 mm, sendo duas amostras obtidas da área de melasma e duas da pele normal adjacente com distância mínima de 1cm entre elas. O primeiro fragmento de cada área foi encaminhado para análise histológica e o segundo para dosagem do óxido nítrico. Desta forma os grupos foram assim definidos: Grupo 1 (pele com melasma) e Grupo 2, ou grupo controle (pele normal).

3.6 Análise histológica

Para a análise histológica os fragmentos de pele foram fixados em formalina a 10% tamponada por 24 horas e submetidos à processamento histológico com inclusão em parafina. Foram então obtidos cortes com espessura de 5µm por meio de um micrótomo e colocados sobre lâminas de vidro. Os preparados foram posteriormente corados pela hematoxilina-eosina (HE). A análise das características histopatológicas foi realizada por dois médicos, um patologista e um dermatologista, sendo que o patologista foi cego com relação a divisão de grupos dos pacientes. Neste protocolo foram avaliados de forma semi-quantitativa 3 cortes sequenciais de cada caso com relação a alterações epidérmicas: apoptose de queratinócitos (presente/ausente) e presença da pigmentação melânica. Para este último parâmetro utilizou-se escores que variaram de 1 a 4, sendo 1 = ausência de pigmento melânico nas cristas epidérmicas, 2 = pigmento melânico presente em raras cristas epidérmicas, 3 = pigmento melânico presente em pelo menos 50% das cristas epidérmicas, 4 = pigmento melânico presente em todas as cristas da epiderme. Além disso, neste protocolo também foram avaliados os seguintes achados dérmicos: telangiectasias (presente/ausente), elastose

solar (presente/ausente), eosinófilos (presente/ausente), mastócitos (presente/ausente) e neutrófilos (presente/ausente). Foram avaliadas ainda a presença de melanina livre e quantidade de melanófagos na derme pelo qual também foram atribuídos escores de 0 a 4, sendo 0 = ausente; 1 = raro; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = intenso (41).

3.7 Análise quantitativa das concentrações de nitrito/nitrato

As amostras obtidas pelas biópsias foram maceradas com 1mL de água destilada até a obtenção de um homogeneizado (Figura 4).

A detecção do óxido nítrico em material biológico é um desafio, pois se trata de um gás com baixas concentrações e de meia-vida muito curta (42). Diferentes métodos têm sido propostos para determinação do NO, tanto direta quanto indiretamente. A determinação direta de NO é obtida utilizando-se metodologias complexas (como a ressonância eletrônica para-magnética (EPR) e a quimioluminescência) e por detecção eletroquímica, utilizando sensores intravasculares. A determinação indireta pode ser realizada por dosagem de nitrato e nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio) (42).

No presente estudo, o óxido nítrico foi quantificado pela formação de seus metabólicos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), utilizando a reação de Griess (43).

A reação de NO_2^- com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada pela medida das densidades óticas em leitor da Elisa (Organon-Teknica, Microwell System, EUA) em 543nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2^- (0-150 μM) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no homogeneizado, em μM , com auxílio da equação da reta (44).



Figura 4 - Protocolo para determinação do óxido nítrico.

3.8 Análise da qualidade de vida

O MelasQol é um questionário validado para a língua portuguesa para avaliar o impacto do melasma na qualidade de vida. Consiste em 10 questões sobre o impacto do melasma sobre sua condição emocional, relações sociais e atividades diárias. O paciente escolhe numa escala que vai de 1 (não incomodado) a 7 (incomodado todo o tempo) sobre como ele se sente sobre a condição de sua pele (Anexo 3). O escore total é calculado pela soma de todas as escalas de todas as questões (variando de 10 a 70).

3.9 Análise estatística

Os resultados dos dados demográficos e clínicos foram expressos em valores absolutos, porcentagens, média e desvio padrão. Na análise histológica os resultados da presença/ausência de apoptose, edema, telangectasias, elastose e celularidade foram expressos em valores absolutos e/ou porcentagens. As diferenças estatísticas entre esses parâmetros no grupo pele com melasma e o grupo controle foram determinadas utilizando-se o teste “t” de Student. As associações entre esses parâmetros foram calculadas utilizando-se o teste Qui-quadrado e Odds Ratio. Para os parâmetros pigmentação epidérmica, melanina livre e melanóforos foram atribuídos escores conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em média dos escores e desvio padrão. As diferenças estatísticas entre esses parâmetros no grupo pele com melasma e o grupo controle foram determinadas utilizando-se o teste “t” de Student. As associações entre esses parâmetros foram calculadas utilizando-se o teste Qui-quadrado e Odds Ratio. Os resultados das dosagens de óxido nítrico foram expressos por média e desvio padrão. Os resultados do MelasQol foram expressos em valores percentuais. Para a análise da associação dos dados demográficos com as questões do MelasQol foi utilizado o teste t de Student. Para a análise estatística foi utilizado o Programa SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA). Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e clínicos

Neste estudo foram selecionados 51 pacientes com diagnóstico clínico de melasma. Todos os pacientes responderam a um questionário sobre seus dados clínicos e o questionário MelasQol. A idade média foi

de $38,43 \pm 6,75$ anos, todos os pacientes eram do sexo feminino, e os fototipos mais comuns foram III (49,02%) e IV (33,33%). A idade média no início da doença e a duração da doença foram de $29,18 \pm 7,05$ e $9,25 \pm 6,18$ anos, respectivamente. Tinham antecedente familiar de melasma 25 (49,02%) pacientes; 45,10% relataram que o início do melasma ocorreu durante a gestação, 9,8% relataram início do melasma com uso de anticoncepcional hormonal, e somente 7,84 % das pacientes tinham antecedente de doença tireoideana (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos e Clínicos de pacientes com melasma.

Pacientes (n = 51)	Valor absoluto e/ou %
Idade média (desvio padrão)	38,43 ($\pm 6,75$) anos
Idade no início da doença média (desvio padrão)	29,18 ($\pm 7,05$) anos
Fitzpatrick Fototipo	
I	0
II	2 (3,92)
III	25 (49,02)
IV	17 (33,33)
V	7 (13,73)
VI	0 (0)
Duração do melasma (desvio padrão)	9,25 ($\pm 6,18$) anos
História Familiar	
Sim	25 (49,02)
Não	26 (50,98)
Início durante uma gravidez	
Sim	23 (45,10)
Não	28 (54,90)
Início com uso de Anticoncepcional hormonal	
Sim	5 (9,80)
Não	46 (90,20)
Doença tireoideana	
Sim	4 (7,84)
Não	47 (92,16)

% = percentual

Entre as 51 pacientes selecionadas, 31 aceitaram ser submetidas às biópsias de pele. Os dados demográficos e clínicos das pacientes

submetidas à biópsia estão apresentados na Tabela 2. A idade média foi de $38,71 \pm 7,69$ anos, todas as pacientes eram do sexo feminino, e os fototipos mais comuns foram III (45,2%) e IV (35,5%). A idade média no início da doença e a duração da doença foram $28,94 \pm 6,77$ e $9,77 \pm 5,71$ anos, respectivamente. Tinham antecedente familiar de melasma 51,6% das pacientes; 45,2% relataram que o início do melasma ocorreu durante a gestação; 12,9% relataram início do melasma com uso de anticoncepcional hormonal, e somente 6,45 % das pacientes tinham antecedente de doença tireoideana. Os dados demográficos das pacientes que se submeteram à biópsia foram semelhantes ao total de pacientes descritos na tabela 1.

Tabela 2 - Dados demográficos e Clínicos das pacientes submetidas à biópsia.

Pacientes (n = 31)	Valor absoluto e/ou %
Idade média (desvio padrão)	38,71 ($\pm 7,69$) anos
Idade no início da doença média (desvio padrão)	28,94 ($\pm 6,77$) anos
Fitzpatrick Fototipo	
I	0
II	1 (3,2)
III	14 (45,2)
IV	11 (35,5)
V	5 (16,1)
VI	0 (0)
Duração do melasma (desvio padrão)	9,77 ($\pm 5,71$) anos
História Familiar	
Sim	16 (51,6)
Não	15 (48,4)
Início durante uma gravidez	
Sim	14 (45,2)
Não	17 (54,8)
Início com uso de Anticoncepcional hormonal	
Sim	4 (12,9)
Não	27 (87,1)
Doença tireoideana	
Sim	2 (6,45)
Não	29 (93,55)

% = percentual

4.2 Avaliação histológica

Foram avaliadas histologicamente 31 amostras obtidas da área lesional e 29 da pele normal, 2 amostras foram inutilizadas devido à artefatos técnicos no processamento tecidual (Figura 5).

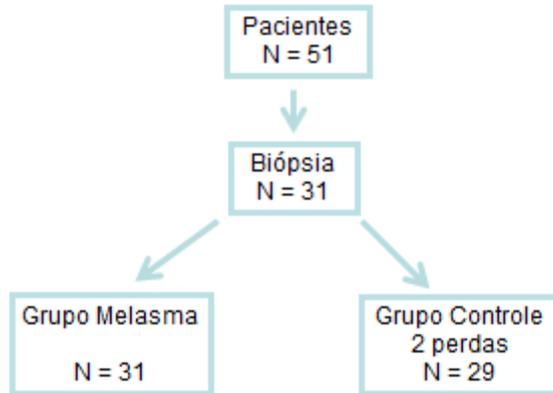


Figura 5 - Total das lâminas avaliadas na histologia.

Os resultados da avaliação histológica estão apresentados na Tabela 3. Apresentaram diferença estatística a presença de elastose ($P = 0,001$) (Tabelas 3 e 4) e aumento da pigmentação na epiderme ($P < 0,001$) (Tabelas 5 e 6, Figura 6) na lesão de melasma em relação à pele normal. A presença de pigmento na derme, sob a forma de melanina livre ou no interior de melanóforos (Tabelas 5 e 6, Figura 7) não mostrou diferença significativa entre a pele normal e a pele com melasma ($P > 0,05$).

Tabela 3 - Resultados da avaliação da presença de apoptose, edema, telangiectasias, elastose, e celularidade na derme de pacientes com melasma.

Dados	Controle (N=29) Valor absoluto (%)	Lesão (N=31) Valor absoluto (%)	Valor de <i>P</i> <i>Teste T</i>
Apoptose	6 (20,7%)	4 (12,9%)	0,264
Edema	22 (75,9%)	21 (67,7%)	0,326
Telangiectasias	27 (93,1%)	30 (96,8%)	0,326
Elastose	12 (41,4%)	26 (83,9%)	0,001
Eosinófilos	7 (24,1%)	5 (16,1%)	0,489
Mastócitos	7 (24,1%)	8 (25,8%)	1,000
Neutrófilos	1 (3,4%)	1 (3,2%)	1,000

% = percentual, *P* = significância

Tabela 4 - Associação entre avaliação histológica da apoptose, edema, telangiectasias, elastose, e celularidade na derme de pacientes com melasma.

Dados	X^2	<i>P</i>	OR
Apoptose	0,65	0,200	0,57
Edema	0,48	0,240	0,67
Telangiectasias	0,42	0,250	2,22
Elastose	11,65	<0,001	7,37
Eosinófilos	0,60	0,210	0,60
Mastócitos	0,02	0,440	1,09
Neutrófilos	0,02	0,440	0,93

X^2 = Qui-quadrado, OR = Odds Ratio, LC = Limite confiança

Tabela 5 - Resultados da avaliação histológica da pigmentação da epiderme, melanina livre e melanóforos na derme de pacientes com melasma.

Dados	Controle (N=29) Média/Desvio Padrão	Lesão (N=31) Média/Desvio Padrão	Valor de <i>P</i>
Pigmentação epiderme	1,76 (0,95)	3,00 (1,04)	< 0,0001
Melanina livre	0,86 (0,95)	0,62 (0,94)	0,0530
Melanóforo	1,86 (1,36)	1,34 (1,17)	0,0900

N = número, *P* = significância

Tabela 6 - Associação entre avaliação histológica da pigmentação da epiderme, melanina livre e melanóforos na derme de pacientes com melasma.

Dados	X^2	<i>P</i>	OR
Presença de pigmentação moderada a intensa da epiderme	15,22	< 0,001	9,37
Presença moderada a intensa de melanóforos na derme	1,86	0,170	0,42
Presença moderada a intensa de melanina livre na derme	0,42	0,510	0,45

X^2 = Qui-quadrado, OR = Odds Ratio, LC = Limite confiança

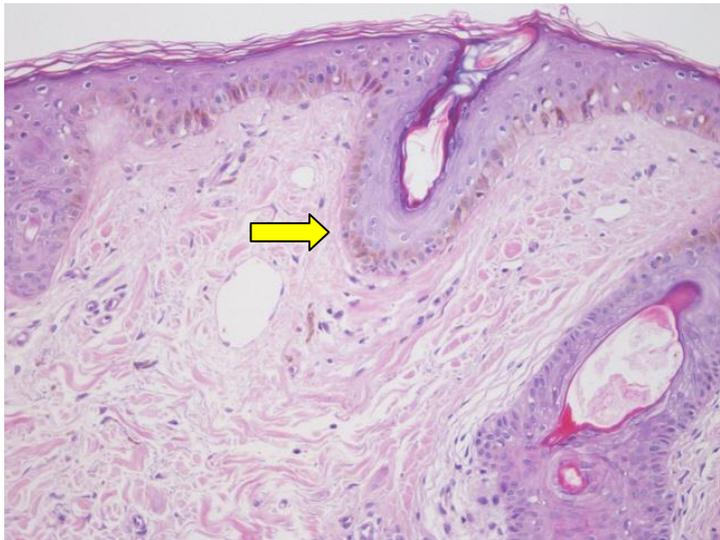


Figura 6 - Cristas epidérmicas mostrando aumento da pigmentação melânica na epiderme na pele com melasma. Coloração Hematoxilina-eosina, aumento 200x.

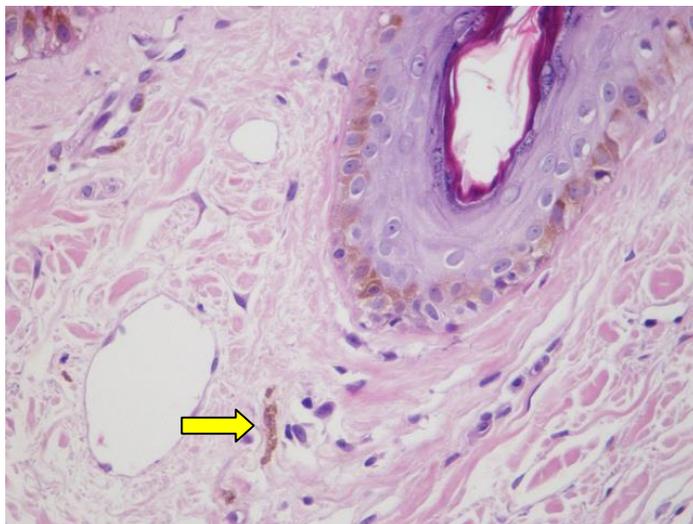


Figura 7 - Presença de melanófagos na derme na pele com melasma. Coloração Hematoxilina-eosina, aumento 400x.

4.3 Dosagem de nitrito/nitrato

A média das concentrações de nitrito/nitrato na pele com melasma foi de $20,62 \pm 17,87$ mU/ml e na pele normal foi de $21,56 \pm 12,37$ mU/ml. Não houve diferença significativa entre pele normal e pele com melasma (Figura 8).

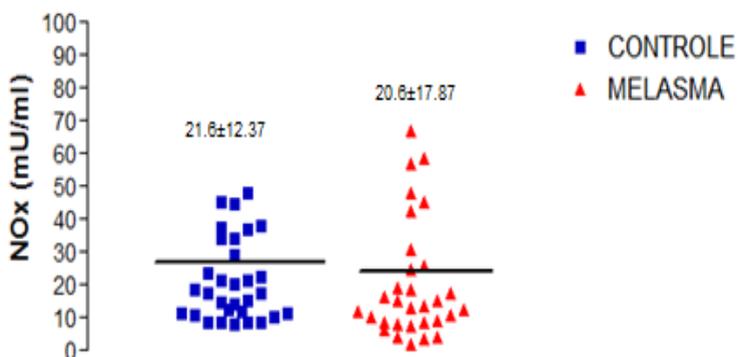


Figura 8 - Dosagem das concentrações dos metabólitos de nitrito/nitrato (NOx) nas lesões de pacientes com melasma comparados com o grupo controle (pele normal) obtida do próprio paciente.

4.4 Qualidade de Vida

Inicialmente foi calculado o fator Cronbach alpha para avaliar a consistência interna do questionário. O resultado demonstrou que o valor do fator Cronbach alpha foi de 0,85 ($P < 0,001$) demonstrando a alta consistência interna do questionário.

A média do escore total do MelasQol foi de $34,40 \pm 13,50$. O valor da média foi utilizado como valor de corte para calcular as associações do MelasQol com os dados demográficos e clínicos.

A análise do MelasQol mostrou que 94,11% dos pacientes sentem-se incomodados com a aparência de sua pele, 64,71% sentem frustração ou constrangimento pela condição de sua pele, 52,94% sentem-se depressivos e 78,43% têm a sensação de não serem atraentes. Entretanto, para 68,63% dos pacientes, o melasma não afeta as relações com outras pessoas, para 70,59% não afeta o desejo de estar com outras pessoas, 86,27% das pacientes não sentem dificuldade em demonstrar afeto, 66,67% não se sentem menos produtivos e para 74,51% dos pacientes o melasma não afeta seu senso de liberdade (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados de cada questão do MelasQol (n = 51).

	Nem um pouco incomodado	Não incomodado na maioria das vezes	Não incomodado algumas vezes	Neutro	Incomodado algumas vezes	Incomodado na maioria das vezes	Incomodado todo o tempo
Aparência de sua pele	3,92	1,96	0	0	25,49	11,76	56,86
Frustração pela sua pele	31,37	0	0	3,92	17,65	19,61	27,45
Constrangimento pela condição de sua pele	31,37	0	0	3,92	23,53	15,69	25,49
Sentindo-se depressivo pela condição de sua pele	39,22	0	0	7,84	23,53	17,65	11,76
Efeitos da condição de sua pele no relacionamento com outras pessoas	68,63	0	0	3,92	15,69	7,84	3,92
Efeitos da condição de sua pele sobre o seu desejo de estar com as pessoas	70,59	0	0	7,84	17,65	1,96	1,96
Condição de sua pele dificulta a demonstração de afeto	86,27	0	0	5,88	3,92	1,96	1,96
As manchas da pele fazem você não se sentir atraente para os outros	19,61	0	0	1,96	29,41	27,45	21,57
As manchas da pele fazem você se sentir menos importante ou produtivo	66,67	0	0	5,88	15,69	3,92	7,84
As manchas de pele afetam o seu senso de liberdade	74,51	0	0	3,92	11,76	9,80	0

MelasQol= questionário de qualidade de vida

Não foram observadas diferenças estatísticas na associação entre diminuição da qualidade de vida (escore total) e as variáveis: idade, fototipo, duração do melasma, história familiar de melasma, início durante a gravidez, início com uso de anticoncepcional hormonal e presença de doença na tireóide (resultados não demonstrados).

A análise de cada questão separadamente mostrou que a média da idade foi significativamente associada a sentir-se incomodada com a aparência da pele ($P = 0,014$) e a sensação de não se sentir atraente ($P = 0,005$). A média da duração da doença foi associada com a sensação de não se sentir atraente ($P = 0,010$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Associação de cada questão do MelasQol com idade e duração da doença.

	Idade (valor de P)	Duração (valor de P)
Aparência da sua pele	0,014*	0,283
Frustração pela condição da sua pele	0,934	0,161
Constrangimento pela condição da sua pele	0,197	0,053
Sentindo-se depressivo pela condição de sua pele	0,318	0,717
Efeitos da condição da sua pele no relacionamento com outras pessoas	0,598	0,621
Efeitos da condição da sua pele sobre o seu desejo de estar com as pessoas	0,318	0,827
Condição da sua pele dificulta a demonstração de afeto	0,787	0,973
As manchas da pele fazem você não se sentir atraente para os outros	0,005*	0,010*
As manchas da pele fazem você se sentir menos importante ou produtivo	0,927	0,811
As manchas da pele afetam o seu senso de liberdade	0,408	0,685

* = $P < 0,05$

5 DISCUSSÃO

As características epidemiológicas das pacientes de nosso estudo foram semelhantes, em alguns aspectos aos estudos da literatura. Em nosso estudo, a média de idade das pacientes foi de $38,43 \pm 6,75$; a média

de idade do início da doença foi de $29,18 \pm 7,05$ e o fototipo de pele mais comum foram os III e IV (82,35%). Numa pesquisa mundial sobre os efeitos da radiação ultravioleta e fatores hormonais envolvidos no desenvolvimento do melasma, a média de idade encontrada foi de $42,90 \pm 9,60$ e 56% dos pacientes apresentavam fototipos III e IV (2). No Brasil, no estudo de Freitag et al, 2008; a média de idade foi de $41,1 \pm 6,8$ anos (45). No estudo de Tamega et al, 2012; 72,8% dos pacientes apresentavam fototipo III e IV (46).

Em nosso estudo, 49,02% das pacientes tinham história familiar de melasma, 45,1% referiram início do melasma durante a gestação e somente 9,8% referiram início após início do uso de anticoncepcional hormonal. No estudo de Ortonne et al (2009); 48% dos pacientes tinham história familiar de melasma, 26% referiram início do melasma na gestação e 25% após uso de anticoncepcional hormonal (2). No estudo de Tamega et al, 2012; 56,3 % tinham história familiar positiva para melasma, 36,4% referiram início do melasma na gestação, e 16,2 % após uso de anticoncepcional hormonal (46).

Em relação à análise histológica, encontramos diferenças estatísticas na presença de elastose solar na derme e maior pigmentação melânica na epiderme nas amostras de pele na área do melasma em relação às amostras de área de pele normal. Esses achados estão de acordo com os outros estudos que compararam a histologia da pele com melasma em relação à pele normal. Barrera-Hernandez et al, 2008 (11) avaliaram 27 pacientes com melasma e encontraram elastose na pele com melasma, aumento do número de mastócitos, aumento de melanina na epiderme, aumento de melanóforos na derme e não encontraram quantidades significativas de melanina livre. Em nosso estudo encontramos também maior presença de elastose na derme da pele com melasma, porém a quantidade de mastócitos nessa região foi semelhante ao encontrado na pele normal. A quantidade de melanóforos e melanina livre na derme da pele com melasma em nosso estudo também não mostrou diferença significativa em relação à pele normal. Miot et al (2007) (48) encontraram resultados semelhantes aos nossos, aumento da melanina na epiderme e elastose na derme na pele com melasma; e também não encontrou diferença entre a pele com melasma e a pele normal em relação à presença de melanóforos na derme. Kang WH et al (2002) (12) realizaram biópsias da pele com melasma e da pele normal adjacente de 56 pacientes coreanas e corroborando os nossos resultados, mostrou diferença entre os grupos em relação à pigmentação na epiderme e elastose na derme. Esses autores detectaram ainda no mesmo

estudo através de imuno-histoquímica aumento do número de melanócitos, e através de microscopia eletrônica, aumento do número de melanossomos. Grimes et al (2005) (9) avaliaram 21 pacientes com melasma e encontraram também aumento da pigmentação epidérmica na pele com melasma em relação à pele normal, porém não encontraram diferenças significativas em relação à elastose na derme. Por imuno-histoquímica e microscopia eletrônica, os autores demonstraram a presença de melanócitos maiores, mais pigmentados, com aumento de melanossomos, com dendritos mais proeminentes, sem aumento do número de melanócitos. Torres-Alvarez et al, 2011 (49) observaram elastose solar, e dano na membrana basal, dado este não observado nos estudos anteriores (9, 12). Esses estudos, apesar de divergirem em alguns aspectos são unânimes em aceitar a hipótese de que o melasma decorre de uma hiperfunção dos melanócitos promovendo aumento da melanina na epiderme. Os fatores envolvidos no desencadeamento e manutenção desses melanócitos hiperfuncionantes ainda não estão elucidados.

Outro mediador importante envolvido no melasma é o óxido nítrico. Na pele, melanócitos e queratinócitos produzem NO em resposta a citocinas inflamatórias; e os queratinócitos em resposta à radiação UV (51). O NO é um potente estimulador da atividade da tirosinase e portanto da síntese de melanina induzida pela radiação UVB pela ativação da guanilato ciclase intracelular, promovendo o aumento do GMPc (48). O óxido nítrico também tem participação na produção de eumelanina e feomelanina em cultura de melanócitos, sendo que a maior produção de eumelanina induzida pelo NO contribui para a hiperpigmentação (21). Apesar de diversas publicações sobre o papel do NO na melanogênese, até o momento somente um trabalho pesquisou o papel do NO no melasma. Jo et al, 2009 (17) demonstraram aumento da NOSi, na membrana basal da epiderme na pele com melasma utilizando a técnica de imuno-histoquímica. Além disso, encontraram expressão de RNAm para NOSi na pele com melasma utilizando a técnica de PCR-RT. Em nosso estudo realizamos a dosagem de nitrito/nitrato que são metabólitos do NO na pele lesional e perilesional, porém não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

Em relação à qualidade de vida, diversos estudos demonstraram que o melasma tem importante impacto na qualidade de vida (36-38). Em nosso estudo a média do escore total foi de $34,40 \pm 13,50$. Em outros estudos brasileiros a média foi de $44,4 \pm 14,9$ (37); $37,5 \pm 15,2$ (45); e $27,2 \pm 13,4$ (47). O último estudo foi realizado em mulheres

grávidas, o que pode explicar os valores mais baixos da média do escore total.

Em nosso estudo o domínio da qualidade de vida mais afetado pelo melasma foi o bem estar emocional, pelo qual 94,11% das pacientes sentiram-se incomodadas com a aparência de sua pele, sendo que 56,86% sentiram-se incomodadas todo o tempo; e 78,43% não se sentiam atraentes pela presença das manchas. Diferente de outro estudo realizado por Balkrishnan et al (2003) (35), as relações sociais foram pouco afetadas pelo melasma em nosso estudo, 74,51% não sentiram que as manchas afetavam seu senso de liberdade e em 68,63% das pacientes, o melasma não afetou as relações com outras pessoas.

A análise do escore total com os dados demográficos e clínicos não demonstrou diferença estatística associada com a redução na qualidade de vida ($P > 0,05$). Esse resultado pode ter ocorrido pelo fato do MelasQol compreender vários domínios da qualidade de vida como trabalho, relações familiares, vida social, recreação e lazer, saúde física e bem estar emocional (35).

Quando analisamos cada questão separadamente observamos que a maior idade associou-se à maior sensação de sentir-se incomodada pela aparência da pele, e à sensação de não se sentir atraente ($P < 0,05$). Porém temos que considerar que essa associação pode ter um viés, pois em nossa sociedade atual, as mulheres não querem envelhecer, portanto mulheres de maior idade podem ter diminuição da qualidade de vida sem ter relação com o melasma.

A maior duração do melasma também se associou com a maior sensação de não ser atraente. Porém a maior duração do melasma não se refletiu em maiores escores totais, tampouco nas questões relativas ao domínio emocional.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que no melasma ocorre aumento de elastose solar e há associação com o aumento da pigmentação na epiderme.

Não houve diferença estatística nas concentrações de nitrito/nitrato na pele com melasma quando comparada com a pele normal.

O melasma está implicado também no impacto na qualidade de vida, e nosso estudo demonstrou que o domínio da qualidade de vida mais afetado pelo melasma foi o bem estar emocional, e que houve pouco impacto no domínio das relações sociais.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho será continuado como parte da tese de doutorado da aluna Juliana Kida Ikino. Utilizaremos o material já coletado para a realização de imuno-histoquímica para avaliar a integridade da membrana basal, número de melanócitos, expressão de NOSi, α -MSH, MC1R e VEGF.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a Comprehensive update: part I. *J Am Acad Dermatol* 2011;65 (4):689-697.
2. Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M, Cestari T, Chan H, Grimes P, et al. A global survey of the role of Ultraviolet Radiation and hormonal influences in the development of melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23(11):1254-1262.
3. Perez M, Luke J, Rossi A. Melasma in Latin Americans. *J Drugs Dermatol* 2011;10(5):517-523.
4. Censo Dermatológico da SBD, 2006 [Acesso em Janeiro 2013]. Disponível em: www.sbd.org.br/medicos/atualidade/censo_dermatologico2006.pdf.
5. Pericles, C, Gomes Neto, A, Nunes, S, Lupi, O. Doenças dermatológicas no Brasil: perfil atitudinal e epidemiológico. *An Bras Dermatol* 2010;85(S1):5-19.
6. Hexsel D, Rodrigues TC, Dal'Forno T, Zechmester-Prado D, Lima MM. Melasma and pregnancy in southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23(3):367-368.
7. Miot LDB, Miot HA, Silva MGD, Marques MEA. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol* 2009;84(6):623-35.
8. Rendon, M, Berneburg, M, Arellano, I, Picardo, M. Treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol* 2006;54(5):S272-281.
9. Grimes PE, Yamada N, Bhawan J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma. *Am J Dermatopathol* 2005 ;27(2):96-101.
10. Miot LD, Miot HA, Polettini J, Silva MG, Marques ME. Morphologic Changes and the Expression of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone and Melanocortin-1 Receptor in Melasma Lesions: A Comparative Study. *Am J Dermatopathol* 2010; 32(7):676-82.
11. Hernández-Barrera R, Torres-Alvarez B, Castanedo-Cazares JP, Oros-Ovalle C, Moncada B. Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma. *Clin Exp Dermatol* 2008;33(3):305-308.
12. Kang WH, Yoon KH, Lee ES, Kim J, Lee KB, Yim H, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002 ;146(2):228-237.
13. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim J, Lee E, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol* 2006;154(6):1094-1099.

14. Bak H, Lee HJ, Chang SE, Choi JH, Kim MN, Kim BJ. Increased expression of Nerve Growth Factor Receptor and Neural Endopeptidase in the Lesional Skin of Melasma. *Dermatol Surg* 2009;35(8):1244-50.
15. Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol* 2002; 146(1):165-167.
16. Dong Y, Cao J, Wang H, Zhang J, Zhu Z, Bai R, et al. Nitric oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to alpha-melanocyte-stimulating hormone by up-regulating melanocortin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(4):849-853.
17. Jo H, Kim C, Suh I, Ryu S, Ha K, Kwon Y, et al. Co-localization of inducible nitric oxide synthase and phosphorylated Akt in the lesional skins of patients with melasma. *J Dermatol* 2009;36(1):10-16.
18. Halaban R, Hebert DN, Fisher DE. Biology of Melanocytes. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz S. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6th ed. McGraw-Hill Professional; 2003. p. 127-148.
19. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 2002;50(2):125-133.
20. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007; 445(7130):843-850.
21. Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 2004;38:365-411.
22. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 2009;35(2):193-199.
23. Hirobe T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res* 2005;18(1):2-12.
24. Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tyring SK. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220(3):618-622.
25. Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J* 2008;22(4):1009-1020.
26. Lassalle MW, Igarashi S, Sasaki M, Wakamatsu K, Ito S, Horikoshi T. Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the

- production of eumelanin and pheomelanin in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2003; 16(1):81-84
27. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2010;23(2):75-93.
28. Bar-Shai M, Reznick AZ. Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappaB-mediated protein degradation in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(12):2112-2125.
29. Chan GHH, Fiscus RR. Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells of elderly rats. *Exp Gerontol* 2004;39(3):387-394.
30. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424.
31. Tsatmali M, Graham A, Szatkowski D, Ancans J, Manning P, McNeil CJ, et al. alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes. *J Invest Dermatol* 2000;114(3):520-526.
32. Fecker LF, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. Inducible nitric oxide synthase is expressed in normal human melanocytes but not in melanoma cells in response to tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and lipopolysaccharide. *J Invest Dermatol* 2002;118(6):1019-1025.
33. WHOQOL: Measuring Quality of life - World Health Organization. www.who.int/mental_health/media/68.pdf, 1997.
34. The WHOQOL Group. The World Health Organization Quality of Life Assessment (WHOQOL). Development and psychometric properties. *Soc Sci Med* 1998; 46:1569-1585.
35. Balkrishnan R, McMichael AJ, Camacho FT, et al. Development and validation of a health-related quality of life instrument for women with melasma. *Br J Dermatol* 2003; 149(3):572-7.
36. Dominguez AR, Balkrishnan R, Ellzey AR, Pandya AG. Melasma in Latina patients: cross-cultural adaptation and validation of a quality-of-life questionnaire in Spanish language. *J Am Acad Dermatol* 2006;55(1):59-66.
37. Cestari TF, Hexsel D, Viegas ML, et al. Validation of a melasma quality of life questionnaire for Brazilian Portuguese language: the MelasQoL-BP study and improvement of QoL of melasma patients after triple combination therapy. *Br J Dermatol* 2006;156(1):13-20.

38. Misery L, Schmitt AM, Boussetta S, Rahhali N, Taieb C. Melasma: measure of the impact on quality of life using the French version of MELASQOL after cross-cultural adaptation. *Acta Derm Venereol* 2010;90(3):331-2.
39. Dogramaci AC, Havlucu DY, Inandi T, Balkrishnan R. Validation of a melasma quality of life questionnaire for the Turkish language: the MelasQoL-TR study. *J Dermatolog Treat* 2009;20(2):95-99.
40. World Medical Association. Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet]. <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> [acesso em Setembro 2012].
41. Motohiro A, Furukawa K, Yasumoto K, Inokuchi K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. *Eur Surg Res* 1986;18(1):50-57.
42. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol ed Lab* 2003;39(4):343-50.
43. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126(1):131-138.
44. Fröde-Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides* 1999;20(2):259-265.
45. Freitag FM, Cestari TF, Leopoldo LR, Paludo P, Boza JC. Effect of melasma on quality of life in a sample of women living in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22(6):655-62.
46. Tamega AD, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol*, e-pub 2012.
47. Purim KS, Avelar MF. Photoprotection, melasma and quality of life in pregnant women. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2012;34(5):228-34.
48. Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol* 2007; 82(6):529-34.
49. Torres-Alvarez B, Mesa-Garza IG, Castanedo-Cazares JP, Fuentes-Ahumada C, Oros-Ovalle C, et al. Histochemical and immunohistochemical study in melasma: evidence of damage in the basal membrane. *Am J Dermatopathol* 2011;33(3):291-5.
50. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1493-1506.

51. Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by UV-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99, 635-42.
52. Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 1996; 271(45):28052-6.

ANEXO 1 - Fototipos de Fitzpatrick

Fototipo	Descrição	Sensibilidade ao Sol
I - Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II - Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III - Morena Clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV - Morena Moderada	Queima pouco, bronzeia facilmente	Normal
V - Morena Escura	Queima raramente, bronzeia facilmente	Pouco sensível
VI - Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

ANEXO 2 - COMITÊ DE ÉTICA

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pré-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 1802

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

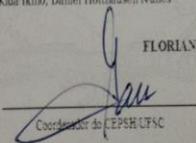
APROVADO

PROCESSO: 1802 FR: 398325

TÍTULO: Estudo da resposta inflamatória em pacientes com melasma

AUTOR: Tania Silvia Frode, Juliana Kida Ikino, Daniel Holthausen Nunes

FLORIANÓPOLIS, 28 de Fevereiro de 2011.


Coordenador do CEPSH/UFSC

Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador do CEPSH/UFSC

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA, CONFORME RESOLUÇÃO Nº 196 DE 10/10/96, DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

Título da Pesquisa: “Estudo da resposta inflamatória em pacientes com melasma”

Coordenadora do Projeto: Prof. Dra. Tânia Silvia Fröde

Pesquisadoras Responsáveis: Prof. Dra. Tânia Silvia Fröde e Dra. Juliana Kida Ikino

Introdução: Convidamos você a ler atentamente as informações contidas neste documento, antes de consentir a sua participação como voluntário colaborador desta pesquisa. Aqui estão os esclarecimentos sobre os objetivos, os benefícios, os riscos, os desconfortos e os procedimentos deste estudo.

Esclarece-se, também, o seu direito de interromper sua participação no estudo qualquer momento, sem prejuízos para a continuidade do seu tratamento.

Resumo: Melasma é uma doença de pele caracterizada pelo aparecimento de manchas escuras em áreas expostas ao sol, principalmente na face, podendo ocorrer também no pescoço, tórax anterior e membros superiores.

Objetivo: o objetivo do presente estudo é estudar a influência da resposta inflamatória no melasma, além de avaliar a qualidade de vida destes pacientes.

Procedimentos: Nós selecionamos pacientes como você, com diagnóstico de melasma. Realizaremos uma entrevista com você, aplicaremos um questionário sobre qualidade de vida e você será fotografado. Após, realizaremos 3 biópsias, ou seja, retiraremos 3 pequenos pedaços de sua pele, 2 fragmentos da pele com melasma e 1 da pele normal para comparação. Essa retirada será realizada no ambulatório de pequenas cirurgias do HU-UFSC. Inicialmente iremos limpar sua pele com gaze e clorexidina. A seguir realizaremos a anestesia local, somente nesse momento você sentirá um leve desconforto. A anestesia local é realizada com a injeção do anestésico na área a ser biopsiada. Realizaremos a biópsia com um instrumento chamado punch, que retira os fragmentos da pele muito pequenos, de até 2 mm. A seguir, realizaremos a sutura (costura) da pele e colocaremos um curativo. Após 5 dias retiraremos os pontos. Você deverá retornar ao ambulatório de dermatologia em 1 mês, com a consulta já marcada.

Não haverá qualquer custo por você fazer parte deste estudo. Você não pagará nada e não receberá qualquer remuneração por essa participação.

Desconforto: Como descrito anteriormente, você poderá sentir algum desconforto durante a aplicação da anestesia local. Você sentirá um leve desconforto nos locais biopsiados até a retirada dos pontos.

Riscos: Pode ocorrer após a biópsia hematomas que se resolvem em até 7 dias. Pode ocorrer que sua cicatrização não evolua bem e você pode ficar com uma cicatriz pequena na área da biópsia.

Caso isso ocorra, entre imediatamente em contato com a pesquisadora mencionada no final deste documento. Faça o mesmo se ocorrerem outras alterações em qualquer momento.

Benefícios: O estudo contribuirá para o esclarecimento das causas do melasma, e no futuro, contribuirá para o desenvolvimento de novos tratamentos para sua doença.

Confidencialidade: As informações fornecidas sobre você serão acessíveis apenas aos pesquisadores. Dentro dos limites da lei, os dados serão mantidos em sigilo.

Contato com as pesquisadoras: Poderá ser feito com a Dra. Juliana Kida Ikino no telefone (48)3721-9133. Em caso de dúvidas em relação aos seus direitos como participante de pesquisa, você deverá ligar para o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, através do número (48)3721-9846.

Consentimento: Li e entendi as informações contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas satisfatoriamente. Eu estou participando desta pesquisa por minha vontade, até que eu decida o contrário.

Eu, _____,

RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Assinatura do paciente

Florianópolis, ____ de _____ de _____

ANEXO 4 - MelasQol- Questionário

Considerando a sua doença, melasma; e a última semana antes desta consulta, como você se sente em relação a:

	Nem um pouco incomodado	Não incomodado na maioria das vezes	Não incomodado algumas vezes	Neutro	Incomodado algumas vezes	Incomodado na maioria das vezes	Incomodado todo o tempo
1) Aparência de sua pele	1	2	3	4	5	6	7
2) Frustração pela sua pele	1	2	3	4	5	6	7
3) Constrangimento pela condição de sua pele	1	2	3	4	5	6	7
4) Sentindo-se depressivo pela condição de sua pele	1	2	3	4	5	6	7
5) Efeitos da condição de sua pele no relacionamento com outras pessoas	1	2	3	4	5	6	7
6) Efeitos da condição de sua pele sobre o seu desejo de estar com as pessoas	1	2	3	4	5	6	7
7) Condição de sua pele dificulta a demonstração de afeto	1	2	3	4	5	6	7
8) As manchas da pele fazem você não se sentir atraente para os outros	1	2	3	4	5	6	7
9) As manchas da pele fazem você se sentir menos importante ou produtivo	1	2	3	4	5	6	7
10) As manchas de pele afetam o seu senso de liberdade	1	2	3	4	5	6	7

