

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Estudo sistemático da ação melanogênica do
extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientando: Frederico Severino Martins

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 10/05/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2016

RESUMO

MARTINS, F. S. Estudo sistemático da ação melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. 2016, 78 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação melanogênica das furanocumarinas, psoraleno e bergapteno assim como do extrato seco das raízes de *Brosimum gaudichaudii* Trécul, contendo 1,2 % m/m de psoraleno, e 5,2 % m/m de bergapteno. A toxicidade celular *in vitro* foi avaliada pelo teste de incorporação do vermelho neutro em quatro linhagens de células diferentes (fibroblastos-L929, queratinócitos-HaCat, Melanoma-B16F10, e melanócitos-Melam-A) e apresentou resposta dose dependente tanto para os fármacos puros quanto para o extrato de *B. gaudichaudii*. Quando expostas à radiação ultravioleta do tipo A e B houve aumento da toxicidade, proporcional a dose de radiação. A mutagenicidade e genotoxicidade realizadas pelos ensaios de micronúcleo e cometa, mostrou que os compostos são genotóxicos e mutagênicos em doses $\geq 150 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A síntese de melanina *in vitro* realizada em cultura de melanoma B16F10 foi dependente da dose e do tempo de exposição aos fármacos e UV. Nas concentrações máximas usadas ($48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno, $104 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bergapteno e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato) o psoraleno aumentou a produção de melanina em 26 %, o bergapteno em 69 %, e o extrato de *B.gaudichaudii* em 163 %. Quando utilizado mistura equivalente $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno e $26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bergapteno a presente em $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato a produção de melanina foi de 61%. A atividade da tirosinase em culturas de B16F10, tratadas com $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno ou bergapteno, quando comparada ao grupo não tratado aumentou em 13% a atividade enzimática, quando associados foi de 37%, e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato em 54,1%. Com o ensaio de microdiálise *in vivo* observou-se que os fármacos são rapidamente absorvidos pela pele e distribuídos no plasma. Ambos os composto apresentaram um cinética linear. O estudo de produção de melanina *in vivo* confirmou que a radiação estimula a produção de melanina assim como o extrato de *B.Gaudichaudii*, e quando associados (PUVA) a síntese de melanina foi 143% maior em comparação ao controle negativo. Os resultados deste trabalho mostrou a capacidade de pigmentação dos fármacos assim como do *B.Gaudichaudii*, revelando ainda o sinergismo entre psoraleno e bergapteno.

Palavras-chave: vitiligo, microdiálise, moraceae, melanina, doenças negligenciadas

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Vitiligo ou “lepra branca” é uma dermatose cutânea adquirida, crônica, idiopática, caracterizada por máculas acrômicas demarcadas ou irregulares (Nordlund, 1997). A despigmentação tem predileção por regiões da pele como orifícios – olhos, narinas, boca, mamilos, umbigo, genitália e regiões passíveis de trauma como cotovelos e mãos (fenômeno de Köebner) (Nordlund, 1997) (Figura 1).

Na dermatologia é considerada uma das dermatoses com efeito psicossocial mais devastador (Middelkamp-Hup, 2007). É causada pela perda de funcionalidade dos melanócitos, porém a precisa etiologia ainda é desconhecida (Antelo Dp.; Filgueira Al.; Cunha, 2008). Várias hipóteses são sugeridas, entre outras, autoimunidade, agentes xenobióticos (Middelkamp-Hup, 2007), fatores genéticos e mutação no gene CAT (Ai-Young, 2006).

Há vários subtipos de vitiligo, sendo os mais comuns o não segmentar (bilateral) com curso crônico, progressivo e imprevisível, cujas alterações imunes dominam o cenário da enfermidade. O segmentar, menos frequente ocorre em áreas limitadas de um lado do corpo, usualmente de progressão lenta com episódios de agravamento e cessão do espalhamento, podendo ocorrer repigmentação espontânea, porém raramente de forma completa (Antelo Dp.; Filgueira Al.; Cunha, 2008).



Fontes : <http://alinepsicoblog.blogspot.com.br/2012/09/vitiligo.html>
<http://protetoresdapele.org.br/sua-pele/vitiligo/>

Figura 1: Vitiligo nas mãos (A), vitiligo generalizado (B)

A prevalência do vitiligo varia entre 1 a 8,5 %, independente de sexo, raça e idade (Nordlund, 1997). Aproximadamente 50% dos indivíduos portadores desenvolvem a doença antes dos 20 anos de idade (Lerner, 1959) e cerca de 25% destes, antes dos 8 anos, sendo em média entre 4 e 5 anos (Halder *et al.*, 1987).

Embora não seja contagiosa ou com risco à vida, é psicologicamente devastadora. Considerando ser mais prevalente na faixa etária dos 8 aos 20 anos, a capacidade desfigurante, e a importância dos valores estéticos impostos à sociedade moderna, os portadores da doença, geralmente, apresentam problemas como baixa autoestima, isolamento social e distúrbios psiquiátricos, que reduzem a qualidade de vida. Essa questão é especialmente importante em crianças e adolescentes, pois estão em processo de formação e desenvolvimento do seu senso de identidade (Mattoo *et al.*, 2001; 2002; Alikhan *et al.*, 2011).

Apesar do vitiligo ser uma doença cosmopolita e com grande impacto para a sociedade, ela é considerada como uma doença negligenciada conforme definido por Sec. 526 of the US Federal Food, Drug and Cosmetic Act (21 USC 360bb) (Valle *et al.*, 2012).

Até o ano de 2010 foram conduzidos apenas 57 estudos sobre o vitiligo (Whitton *et al.*, 2010), esse cenário é decorrente da baixa viabilidade financeira para medicamentos específicos ao vitiligo e baixo incentivo público e privado. O que reflete na qualidade de vida dos portadores (Ezzedine *et al.*, 2012).

Por ser uma doença que não tem a etiologia elucidada, várias linhas de tratamento são propostos, mas todas têm o intuito de reestabelecer a pigmentação da pele, porém com variados graus de sucesso (Roelandts, 2002). Dentre as estratégias de tratamento podemos citar: corticoides tópicos, imunomoduladores, análogos da vitamina D, superóxido desmutase, fototerapia (UVA/UVB) ou PUVA terapia (psoralenos + UVA); porém todas com vantagens e desvantagens (Roelandts, 2002).

As opções disponíveis de tratamento deixam a desejar, pois a completa repigmentação dificilmente ocorre e entre 15 a 30% dos pacientes não respondem a nenhuma delas. Repigmentação em torno de 75% é considerado resultado excelente, porém este é obtido em aproximadamente 60% dos pacientes.

1.1 Etiopatogenia do vitiligo

As causas do vitiligo ainda não são bem elucidadas, mas várias teorias foram propostas para explicar o evento de despigmentação, entre outras, a autoimune, genética, tóxica, neural e bioquímica.

1.2 Teoria autoimune

Vitiligo é frequentemente associado com doenças autoimunes ou que comprometem o sistema imunológico, como doenças da tireoide, Addison, Hashimoto, lúpus eritematosos, artrite reumatoide, síndrome de Vogt-Kauanagi-Harada, psoríase, *Lichen planus*, *miastenia gravis* e, em caso de anemias. Casos de vitiligo muitas vezes são precedidos por doenças com manifestação clínica ou subclínica (Ongena *et al.*, 2003; Engin *et al.*, 2008). Anticorpos anti tirosinases, TRP 1 e 2, Pmel17, MelanA, MART-1, MCR-1, HLA-DR, fatores de transcrição SOX 9 e 10, interleucinas I e II, e super expressão dos receptores de superfície Fc e C3b nas células de Langerhans, assim como imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG3, e a proteína C3 da ativação do sistema complemento são ocasionalmente encontradas na membrana basal dos queratinócitos e melanócitos de pacientes com vitiligo (Rezaei *et al.*, 2007).

Estudos sobre células mononucleares do sangue periférico utilizando anticorpos monoclonais associados a análises de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência revelaram presença de anormalidades nas células T e natural Killer em pacientes com vitiligo, mas devido à heterogeneidade dos pacientes não foi possível estabelecer um padrão celular característico. (Abraham *et al.*, 1993).

1.3 Teoria genética

Componentes genéticos, multifatorial e hereditário vêm sendo observados em pacientes com vitiligo, cerca de 20 % dos portadores têm um familiar de primeiro grau com vitiligo (Alkhateeb *et al.*, 2002). Majumder *et al.* (1993) verificaram que pelo menos três genes alelos são comuns em pessoas com vitiligo, sendo tido como uma desordem poligênica. Em estudos genômicos com 71 famílias brancas e com casos de vitiligo, foram identificadas a presença de AIS1 (marcador genético e auto-imune do diabetes melito tipo 1), locus ativado 1p31 (acil-coenzima A desidrogenase, dihidrolipoamido de cadeia ramificada transacilase E2, família DIRAS, GTP-binding

RAS-like 3) e p32.2 (carnitina palmitoiltransferase II) do cromossomo 17, 8, 11, 19, e 22 (Majumder *et al.*, 1993).

1.4 Teoria tóxica

Essa teoria é baseada no fato de que os fenóis e seus derivados são altamente citotóxicos para as células produtoras de melanina. Segundo Lerner (1971), os melanócitos possuem mecanismos capazes de eliminar produtos endógenos tóxicos como dopaquinona e diidroxindol produzidos durante a síntese de melanina. Em pessoas que por alguma razão esse mecanismo é falho, o acúmulo dessas substâncias pode levar à destruição dos melanócitos (Riley, 1970; Lerner, 1971).

1.5 Teoria neural

Os melanócitos são células derivadas da crista neural durante a formação embriológica, assim alguns autores acreditam que doenças ligadas ao sistema nervoso também podem afetar os melanócitos. Foram observados casos de vitiligo em pessoas com desordem do SNC ou doenças que acometem o sistema nervoso, como neurofibromatose, esclerose tuberosa, sífilis, hanseníase, encefalites virais, e esclerose múltipla (Nelhaus, 1970; Barnes, 1988; Parichy *et al.*, 2007).

1.6 Teoria bioquímica

Tem sido amplamente investigada a hipótese de que o vitiligo possa ser causado por uma disfunção metabólica, não necessariamente relacionada com os melanócitos, o que levaria à produção de metabólitos tóxicos, como catecolaminas, quinonas e espécies reativas de oxigênio (Huang *et al.*, 2002; Dell'anna e Picardo, 2006).

As manchas do vitiligo apresentam fluorescência à luz de Wood, devido ao acúmulo excessivo de 6-biopterina com fluorescência rósea e 7-biopterina com fluorescência amarelo-esverdeada nas bordas da lesão. Substâncias como L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano são derivados do metabolismo celular e sua presença é comumente encontrada durante a ativação da imunidade celular e em pessoas com vitiligo ativo. Ainda não se sabe a razão pela qual essas moléculas se tornam citotóxicas para os melanócitos (Naughton *et al.*, 1986; Schallreuter *et al.*, 2008).

Danos por estresse oxidativo e o aumento da presença de H₂O₂ são evidentes em pacientes com vitiligo ativo. Assim como foi observado que os melanócitos das bordas das lesões são mais sensíveis ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo tem sido atribuído a diferentes fatores endógenos, entre outros, distúrbio na atividade da monoamina-oxidase A (MAO-A), NADPH-oxidase e síntese e regulação da 6R -L-eritro 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (6-BH₄). Pacientes com vitiligo têm atividade enzimática reduzida (catalase e glutathione oxidase), assim como de vitamina E, componente nutricional com atividade antioxidante (Lerner, 1971; Naughton *et al.*, 1986; Barnes, 1988; Lei *et al.*, 1997).

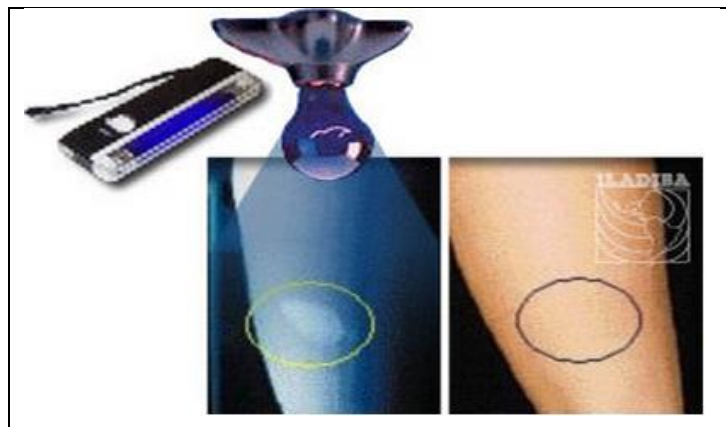
Estudos têm relatado o envolvimento dos sistemas adrenérgico e colinérgico no desenvolvimento da doença (Iyengar, 1989). Acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima na promoção e manutenção do estresse oxidativo, sendo inativada por oxidação das tirosinases e metilases por H₂O₂. Curiosamente, a atividade da AChE é baixa em lesões de vitiligo, mas retorna ao normal quando o tratamento e a pigmentação se iniciam (Schallreuter *et al.*, 2004). Picardo *et al.* (1994) relataram a liberação anormal de catecolaminas em terminações nervosas autonômicas o que resulta produção excessiva de radicais livres. Além disso, níveis elevados de metabólitos de catecolamina na urina de pacientes com vitiligo foram observados durante o período ativo da doença.

1.7 Teoria de adesão

Essa teoria é explicada pelo aparecimento do vitiligo após traumas na pele, como escoriações, mordidas de animais, lacerações, queimaduras, uso de lâminas, ceras depilatórias, atrito e dermatite constantes sobre certa região da pele. Esse fenômeno foi descrito por Köebner e é conhecido como fenômeno Köebner que relatou que 31% dos pacientes com vitiligo tiveram traumas prévios na pele (Gauthier *et al.*, 2003). Estudos com imuno-histoquímica demonstraram a reduzida expressão da glicoproteína de adesão, tenascina em portadores de vitiligo. (Lightner e Erickson, 1990; Njoo *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 2003).

No Brasil não há diretrizes médicas para o diagnóstico do vitiligo, desta forma, muitos dos médicos brasileiros seguem o *Guidelines European Dermatology* (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013). Atualmente o diagnóstico é clínico, sendo necessária a exclusão de outros distúrbios da pele como: pitiríase alba, hipopigmentação pós-

inflamatória, piebaldismo, além da hipopigmentação induzida quimicamente com catecóis, fenóis alquilados e aldeído cinâmico (Prose, 2005). A *lâmpada de Wood* pode ser usada para diferenciar e avaliar as dimensões da lesão, quando o paciente tem pele clara e de difícil distinção (Figura 2).



Fonte : <http://www.gentenatural.com/medicina/patologias/vitiligo.htm>

Figura 2: Vítigo visualizado em *lâmpada de Wood*

A mancha causada pelo vitiligo tem as bordas delimitadas, já a lesão por pitiríase alba apresenta irregularidades sutis podendo ter escamações da pele. O piebaldismo é uma doença autossômica e os portadores já nascem com a hipopigmentação, ao contrário do vitiligo que se desenvolve durante a vida. A hipopigmentação pós-inflamatória, ocorre após inflamação severa, sendo um evento raro e reversível. A despigmentação causada por agentes químicos é diferenciada do vitiligo pelo relato do paciente à exposição, se a extensão da área afetada for pequena geralmente a cor da pele se reestabelece (Taieb, 2000; Balkrishnan *et al.*, 2004).

1.8 Tratamento

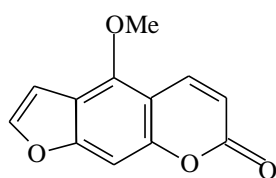
Na ANVISA não há registro de medicamento específico para o tratamento do vitiligo. Desta forma todas as linhas de tratamento baseiam-se em medicamentos considerados *off label*. A primeira linha de tratamento proposta pelo *Guidelines European Dermatology* (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013) são os imunomoduladores como: corticosteroides tópicos ou oral; inibidores de calcineurina; tracolimo; e primecolimus (0,1%) (Njoo *et al.*, 1998; Westerhof W, 1999). Destes, os corticosteroides são tidos como a classe de primeira escolha, devido ao baixo custo e janela terapêutica ampla, no entanto a remissão da lesão se dá em 33 % dos casos, sendo que o uso prolongado pode

ocasionar efeitos colaterais como glaucoma, hipertensão arterial sistêmica, aumento de peso e catarata (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013).

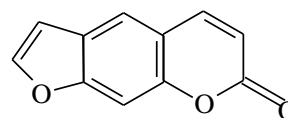
A eficácia dos inibidores de calcineurina, tracolimo, e primecolimus é em torno de 54%, no entanto, são medicamentos caros e não disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento de vitiligo, havendo ainda o risco de causar queimaduras e hiperpigmentações permanentes (Russell, 2002).

A fototerapia é outra linha de tratamento muito utilizada, na qual a produção de melanina é estimulada pela exposição do paciente à luz ultravioleta (UV) e sua eficácia varia entre 40-60%. No entanto, ela é nociva para peles desnudas de melanina, protetor natural contra UV. Atualmente há estudos que comprovam a eficácia de comprimentos de onda de espectro estreito (NB-UVB (311-313 nm), BB-UVB (280-320 nm) e Xenon (308 nm), que são mais seguros evitando danos no DNA (Gawkrodger *et al.*, 2008; Silverberg, 2010).

A PUVA terapia, tem eficácia elevada, de cerca de 70-80%, independente da cronologia da doença e é baseada no uso de furanocumarinas associadas com UV. O *Guidelines European Dermatology* recomenda o uso oral de $1,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$, ou 0,001% para uso tópico com posterior exposição ao UV e três repetições por semana (Taieb, Alomar, Boehm, *et al.*, 2013). Os psoralenos são furanocumarinas lineares (Figura 3), que podem ser obtidos por síntese orgânica (processo caro e que gera muitos resíduos químicos) ou extraídos de vegetais como: *Carolus Linnaeus* (L.) - Burm, *Ficus* sp; *Brosimum gaudichaudii* Trécul e outras espécies da família Moraceae (POZETTI & BERNARDI, 1971).



Bergapteno



Psoraleno

Fonte: POZETTI & BERNARDI, 1971.

Figura 3: Furanocumarinas

Apesar da PUVA no tratamento de vitiligo ser uma terapia de uso milenar (2000 a.c) ainda hoje há muitas informações contraditórias em relação a sua segurança e

eficácia. Isoldi *et. al.* (1999) relataram que após 72 horas de exposição do melanoma SK-Mel 28 e C32TG ao PUVA houve um aumento da atividade da tirosinase e da melanogênese, sendo que o mesmo não foi observado na ausência de UVA. Resultados opostos foram descritos por Quevedo *et.al* (2011), em que o 5-MOP não associado à UV foi capaz de estimular a produção de tirosinase e melanina.

A atual legislação brasileira (RE nº 88/04, RE nº 89/04, RE nº 90/04, RE nº 91/04) exige, para o registro de fitoterápicos, a realização de testes que avaliem a eficácia e a segurança dos medicamentos. Os estudos de segurança de toxicidade celular, genotoxicidade e mutagenicidade são fundamentais para subsidiar estudos pré-clínicos e posteriormente os clínicos.

1.9 *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)

Brosimum gaudichaudii Trécul (Figura 4) é popularmente conhecida como mama cadela, arbóreo de cadela ou algodãozinho do campo. A espécie é caracterizada pelo porte arbustivo, chegando a 4 m de altura, com folhas simples, pecioladas, inflorescências formadas por flores unissexuadas pistiladas e estaminadas. Os frutos são monocárpicos, com receptáculo latescente, globoso e carnoso, que quando maduros, apresentam coloração alaranjada, cuja polpa latescente é adocicada e comestível (BARROSO *et al.*, 2002). Em suas raízes, caules e folhas, é encontrado látex (Figura 4c) de odor característico, usado pela “medicina popular” no tratamento de vitiligo (BARROSO *et al.*, 2002).



Nota : a) Exemplar adulto de *B.gaudichaudii*; (b) Frutos de *B. gaudichaudii*; (c) Látex do caule de *B. gaudichaudii*.

Figura 4: *Brosimum gaudichaudii* Trécul

Essa espécie está distribuída em todo país (Figura 5), com predominância no cerrado típico, cerradão e mata mesofítica dos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (BARROSO et al., 2002).



Fonte: adaptado de ALMEIDA et al. 1998. Nota: Os pontos vermelhos indicam a distribuição do *B. gaudichaudii*.

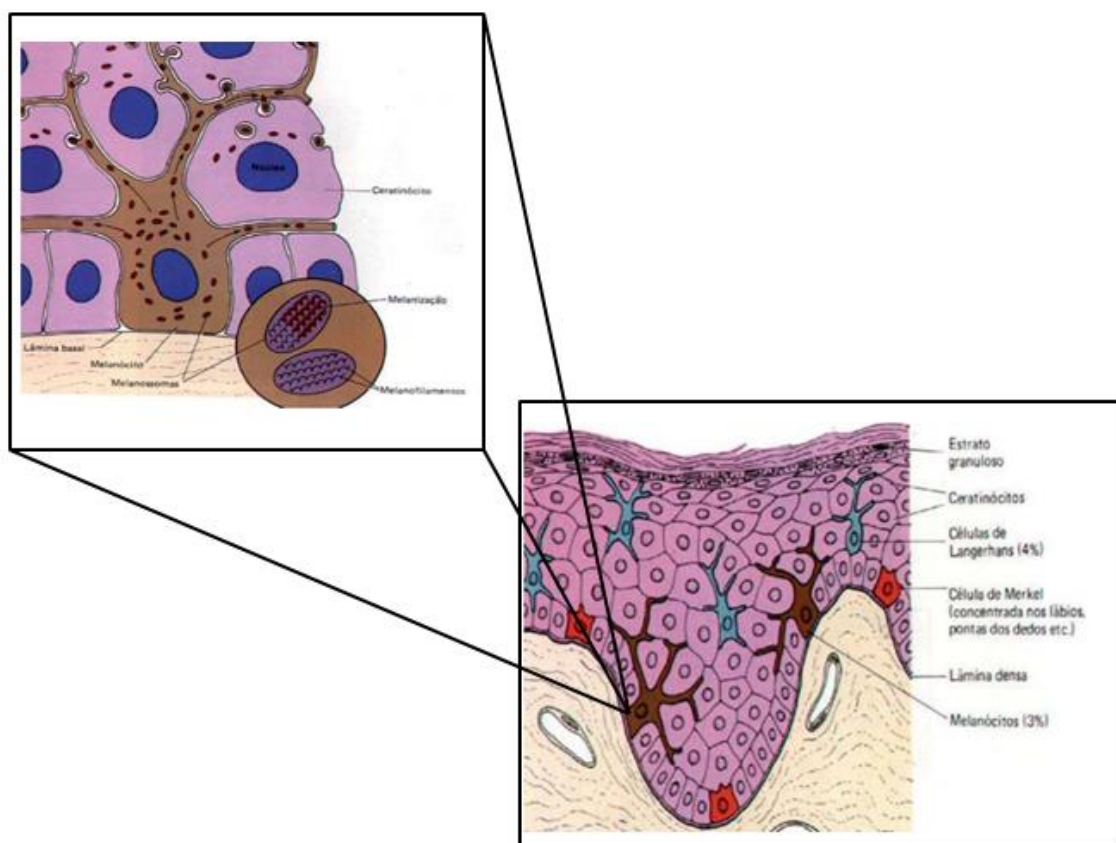
Figura 5: Mapa de dispersão do *B. gaudichaudii*.

O *B.gaudichaudii* é uma espécie domesticada e com viabilidade agrônômica. Essa característica é importante por garantir matéria prima caso essa espécie se torne insumo de um fitoterápico.

1.10 Melanogênese

Os melanócitos são células dendríticas, derivadas dos melanoblastos, os quais se originam da crista neural, sua migração para a pele ocorre após o fechamento do tubo neural (Erickson, 1993). Quando se tornam células completamente desenvolvidas, distribuem-se em diversos tecidos, órgãos e anexos (Bomirski et al., 1988).

Na pele, os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme e, ocasionalmente, na derme, seus dendritos se inserem na camada malpighiana, onde transferem seus melanossomas aos queratinócitos (Figura 6). As unidades epidérmico-melânicas são formadas pela associação de melanócitos e queratinócitos na proporção de 1:30. O número de melanócitos/mm² é em torno de dois mil nas áreas mais expostas ao UV e cerca de mil no restante do corpo (Jimbow *et al.*, 2000). Os diferentes tons de pele e pelos não dependem do número de melanócitos, mas sim, do grau da atividade de síntese da melanina e da proporção entre eumelanina e feumelanina sintetizada (Jimbow *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

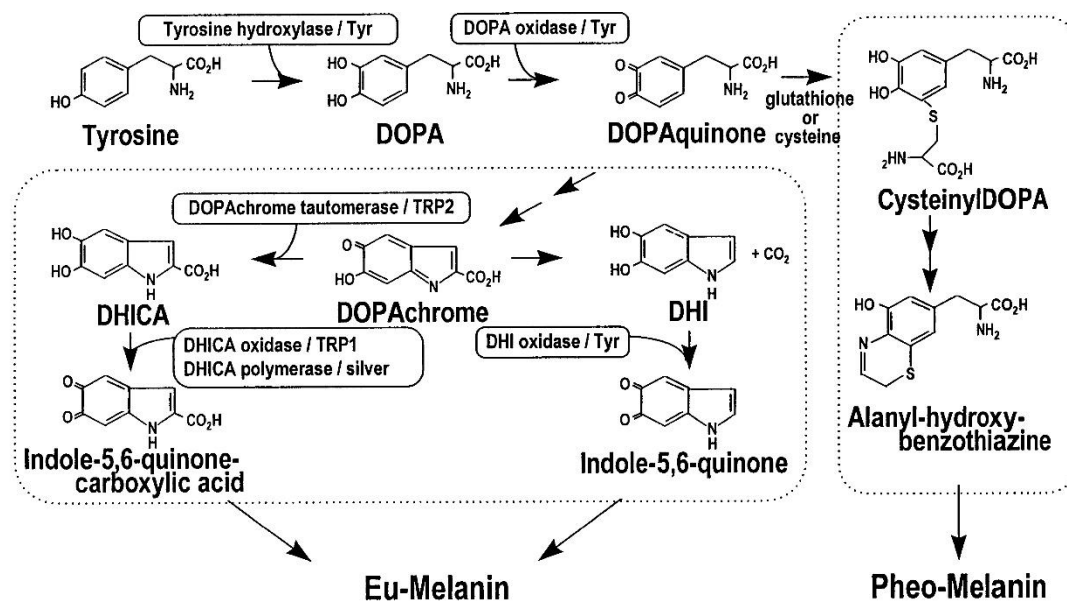


Fonte : Storm C.A et al., 2006

Figura 6: Disposição dos melanócitos na epiderme

A síntese da melanina é restrita aos melanossomas contidos nos citoplasmas dos melanócitos (Miranda e Botti, 1983; Jimbow *et al.*, 2000; Jimbow K, 2000), e é iniciada pela hidroxilação da tirosina pela ação da tirosina hidroxilase, formando a DOPA, sendo oxidada pela DOPAquinase formando a DOPAquinona (PHILIPPSEN, 2006; KORMOS *et al.*, 2010). A DOPAquinona é um intermediário altamente reativo,

que na ausência de compostos tióis sofre ciclização, levando à produção de eumelanina, de cor preta ou marrom. Na presença de compostos com grupos tióis, como cisteína, leva à geração de cisteinilDOPAs, e a produção da feomelanina, de cor vermelha ou amarelada (Figura 7) (Ito *et al.*, 2000). A síntese da melanina é um processo dependente de oxigênio e cisteína, o que leva à redução de glutatona, antioxidante endógeno (ROS) (SMIT *et al.*, 2008).



Fonte: (Ito *et al.*, 2000)

Figura 7: Representação esquemática da Melanogênese.

O desenvolvimento do melanossoma é dividido em quatro etapas; i) inicia-se a organização da matriz dos melanossomas, vesículas com material fibroso, sem melanina; ii) a matriz já está organizada com fibras em feixes alongados e paralelos, com aspecto estriado característico dos melanossomas; iii) inicia a produção de melanina e deposição sobre os feixes fibrosos e; iv) ao final da etapa 4 o melanossomas estão totalmente preenchidos por melanina (Bomirski *et al.*, 1988).

Em geral, o formato dos melanossomas está relacionado ao tipo de pigmento produzido. Melanossomas que sintetizam eumelanina tem forma elíptica e contem matriz fibrilar, enquanto que os que contem feumelanina são arredondados com vesículas globulares (Hsin-Su, 1999).

Quando os melanócitos da pele são expostos à radiação UV, ocorre a síntese de diversos fatores epidérmicos que estimulam a melanogênese, como os hormônios

α -MSH e ACTH (Rees e Healy, 1997; Wikberg *et al.*, 2000; Rouzaud *et al.*, 2005). Estes agem como regulador parácrino, estimulando a melanogênese (estímulo do receptor MC1R), proliferação e sobrevivência dos melanócitos (Halaban *et al.*, 1988; Imokawa *et al.*, 1992). O α -MSH bloqueia a apoptose induzida pela radiação UVB e, acelera o reparo do DNA, induzidos, pela radiação (Bohm, 2005).

Conclusões

5 CONCLUSÕES

O método analítico foi adequado para a identificação e quantificação do psoraleno e bergapteno em amostras de *B.gaudichaudii*, amostra biológica e em gel de HPMC.

A caracterização do extrato permitiu estabelecer correlação entre os teores dos marcadores químicos e atividade biológica.

Em quantidades equivalentes bergapteno foi mais seguro que o psoraleno e o extrato, no entanto, em relação à massa total, a dose segura de extrato é até 10 vezes maior que os fármacos puros. A associação entre fármacos e UV aumentou a toxicidade, sendo o UVB mais citotóxico que oUVA.

Os compostos estudados foram genotóxicos em concentrações maiores que $150\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas não mutagênicos, sugerindo que a célula é capaz de reparar os danos celular.

Todos os fármacos aumentaram a atividade da tirosinase e a síntese de melanina, em melanoma B16F10. Com destaque para o extrato de *B.gaudichaudii*. Foi observada uma provável ação sinérgica entre o psoraleno, bergapteno e UV. Uma relação entre a síntese de melanina, dose de fármaco e tempo foi observada, sendo diretamente proporcionais. A maior atividade farmacológica do extrato pode ser explicada pelo provável sinergismo de outros compostos no extrato.

Apesar da formulação de HPMC ter sido adequada para a rápida liberação (< 1,0 h) do psoraleno e bergapteno, ela desidratou, o que dificultou a liberação e o estudo farmacocinético *in vivo*. Novos estudos são necessários para estabelecer com maior precisão os parâmetros farmacocinéticos do psoraleno e bergapteno. Para isso, uma nova formulação é necessária. Ainda, se faz necessário um estudo complementar intravenoso, para avaliar a influência da formulação, pele e outros compartimentos na biodisponibilidade dos fármacos.

O extrato de *B.gaudichaudii* estimulou a síntese de melanina em ratos da linhagem C57BL/6, assim como UV e a associação do UV e extrato. A melanogênese ocorreu independente do UV, mas foi maior em sua presença.

O *B.gaudichaudii* é uma espécie promissora para a PUVA terapia, tendo como vantagens: i) menor toxicidade celular, mutagenicidade e genotoxicidade que os compostos isolados; ii) maior efetividade no estímulo da melanogênese; iii) por ser uma espécie endêmica do cerrado brasileiro e por já ser doméstica.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Z. et al. Vitiligo, rheumatoid arthritis and pernicious anemia. **J Dermatol**, v. 20, n. 7, p. 418-23, Jul 1993. ISSN 0385-2407 (Print) 0385-2407.

AGAR, N.; YOUNG, A. R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1–2, p. 121-132, 4/1/ 2005. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704004907> >.

AI-YOUNG, K. A. C. N.-H. K. M. N. Analysis of allelic variations in the catalase gene in patients with the skin depigmentation disorder vitiligo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 345, p. 5, 2006.

ALIKHAN, A. et al. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 3, p. 473-91, Sep 2011. ISSN 1097-6787 (Electronic) 0190-9622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839315> >.

ALKHATEEB, A. et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 6, p. 661-7, Mar 15 2002. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912181> >.

AMEEN, M.; EXARCHOU, V.; CHU, A. C. Topical calcipotriol as monotherapy and in combination with psoralen plus ultraviolet A in the treatment of vitiligo. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 3, p. 476-479, 2001. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2001.04381.x> >.

ANTELO DP.; FILGUEIRA AL.; CUNHA, J. Aspectos imunopatológicos do vitiligo. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 36, n. 3, p. 10, 2008.

AUGUSTO, E. F. P. C., L. R. . **Tecnologia de Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica** Roca. 1: 528 p. 2008.

AVERBECK, D. et al. New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 1, p. 47-63, 1992/06/30 1992. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1011134492850826> >.

BALKRISHNAN, R. et al. Racial differences in the treatment of pigmentation disorders in outpatient settings: analysis of US national practice data. **J Dermatolog Treat**, v. 15, n. 4, p. 227-30, Jul 2004. ISSN 0954-6634 (Print) 0954-6634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764036> >.

BARNES, L. Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. **Dermatol Clin**, v. 6, n. 2, p. 229-39, Apr 1988. ISSN 0733-8635 (Print) 0733-8635.

BETHEA, D. et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of dermatological science**, v. 19, n. 2, p. 78-88, 1999. ISSN 0923-1811. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181198000644?showall=true> >.

BOHM, M. S., T. E.; ROBINSON, S. J.; HEALY, E.; LUGER, T. A.; SCHWARZ, T.; SCHWARZ, A. . A α -Melanocyte-stimulating Hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 7, 2005.

BOMIRSKI, A.; SŁOMINSKI, A.; BIGDA, J. The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 7, n. 2, p. 95-118, 1988/06/01 1988. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00046481> >.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of tissue culture methods**, v.

9, n. 1, p. 7-9, 1985/03/01 1985. ISSN 0271-8057. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01666038> >.

CARNEIRO, J. L. **Histologia Básica**: Guanabara Koogan. 1: 9788527723114 p. 2013.

CHAKRABORTY, A. K. et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. **Biochim Biophys Acta**, v. 1313, n. 2, p. 130-8, Aug 28 1996. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781560> >.

DELL'ANNA, M. L.; PICARDO, M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. **Pigment Cell Res**, v. 19, n. 5, p. 406-11, Oct 2006. ISSN 0893-5785 (Print) 0893-5785.

ENGIN, B. et al. Narrow-band ultraviolet B phototherapy for the treatment of vitiligo: evidence against an autoimmune pathogenesis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 22, n. 12, p. 1520-1, Dec 2008. ISSN 1468-3083 (Electronic) 0926-9959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18355207> >.

ERICKSON, C. A. From the Crest to the Periphery: Control of Pigment Cell Migration and Lineage Segregation. **Pigment Cell Research**, v. 6, n. 5, p. 336-347, 1993. ISSN 1600-0749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb.00611.x> >.

EZZEDINE, K. et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. E1-E13, May 2012. ISSN 1755-1471. Disponível em: < <Go to ISI>://000302935000001 >.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 05//print 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.77> >.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 5, 2007.

GAIVÃO, I. O. N.; SIERRA, L. M. Drosophila Comet Assay: insights, uses and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014-August-29 2014. ISSN 1664-8021. Disponível em: < http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1271&name=genomic_assay_technology&ART_Doi=10.3389/fgene.2014.00304 >.

GAUTHIER, Y. et al. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 1, p. 95-101, Jan 2003. ISSN 0007-0963 (Print) 0007-0963.

GAWKRODGER, D. J. et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. **Br J Dermatol**, v. 159, n. 5, p. 1051-76, Nov 2008. ISSN 1365-2133 (Electronic) 0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036036> >.

HALABAN, R. et al. Basic Fibroblast Growth-Factor from Human Keratinocytes Is a Natural Mitogen for Melanocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 4, p. 1611-1619, Oct 1988. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://A1988Q306200032 >.

HALDER, R. M. et al. Childhood Vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v. 16, n. 5, p. 948-954, May 1987. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <Go to ISI>://A1987H108700005 >.

HEO, S.-J. et al. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1123-1130, 2009. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233309001179> >.

HSIN-SU, Y. The pigmentary system: Physiology and pathophysiology. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 478-478, 1999. ISSN 0003-987X. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10-1001/pubs.Arch Dermatol.-ISSN-0003-987x-135-4-dbk0499](http://dx.doi.org/10.1001/pubs.Arch Dermatol.-ISSN-0003-987x-135-4-dbk0499) >.

HUANG, C. L.; NORDLUND, J. J.; BOISSY, R. Vitiligo: a manifestation of apoptosis? **Am J Clin Dermatol**, v. 3, n. 5, p. 301-8, 2002. ISSN 1175-0561 (Print) 1175-0561.

IMOKAWA, G.; YADA, Y.; MIYAGISHI, M. Endothelins Secreted from Human Keratinocytes Are Intrinsic Mitogens for Human Melanocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24675-24680, Dec 5 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://A1992KA26300079 >.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H. Chemical Analysis of Melanins and its Application to the Study of the Regulation of Melanogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, p. 103-109, 2000. ISSN 1600-0749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.19.x> >.

IYENGAR, B. Modulation of melanocytic activity by acetylcholine. **Acta Anat (Basel)**, v. 136, n. 2, p. 139-41, 1989. ISSN 0001-5180 (Print) 0001-5180.

JIMBOW, K. et al. Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in Eu- and pheomelanosome biogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, p. 110-117, 2000. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <Go to ISI>://000089714000019 >.

JIMBOW K, P. J., KATO F, HIROSAKI K, TOYOFUKU K, HUA C, AND YAMASHITA T. Assembly, target-signaling and the intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stages of melanosome biogenesis. **Pigment Cell Res** v. 13, p. 7, 2000.

JONES, K. et al. Modulation of melanogenesis by aloesin: A competitive inhibitor of tyrosinase. **Pigment Cell Research**, v. 15, n. 5, p. 335-340, Oct 2002. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <Go to ISI>://000177850500003 >.

KANWAR, A. J. et al. Narrow-band UVB for the treatment of vitiligo: an emerging effective and well-tolerated therapy. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 1, p. 57-60, 2005. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02329.x> >.

LEI, X. D. et al. Expression of 4alpha-carbinolamine dehydratase in human epidermal keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 238, n. 2, p. 556-9, Sep 18 1997. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

LERNER, A. B. On the etiology of vitiligo and gray hair. **Am J Med**, v. 51, n. 2, p. 141-7, Aug 1971. ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343.

LIGHTNER, V. A.; ERICKSON, H. P. Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. **J Cell Sci**, v. 95 (Pt 2), p. 263-77, Feb 1990. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533.

MAJUMDER, P. P.; NORDLUND, J. J.; NATH, S. K. Pattern of familial aggregation of vitiligo. **Arch Dermatol**, v. 129, n. 8, p. 994-8, Aug 1993. ISSN 0003-987X (Print) 0003-987X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8352624> >.

MARTINS, F. S., MORAES C.S.S, BARA,.F.T.M, CONCEIÇÃO. Obtainment and characterization of raw material of *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae). **Journal Pharmacy research**, v. 4 n. 10, p. 3, 2010. ISSN 0974-6943.

MATTOO, S. K. et al. Psychiatric morbidity in vitiligo and psoriasis: a comparative study from India. **J Dermatol**, v. 28, n. 8, p. 424-32, Aug 2001. ISSN 0385-2407 (Print)0385-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560159> >.

_____. Psychiatric morbidity in vitiligo: prevalence and correlates in India. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 16, n. 6, p. 573-8, Nov 2002. ISSN 0926-9959 (Print) 0926-9959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482039> >.

MCGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and Organization of Human Skin. In: (Ed.). **Rook's Textbook of Dermatology**: Blackwell Publishing, Inc., 2008. p.45-128. ISBN 9780470750520.

MIDDELKAMP-HUP, M. B., JD.; RUIZ-DIAS, F ET AL. Treatment of vitiligo vulgaris with a narrow-band UVB and oral polypodium leucotomos extract: a randomized Double-blind placebo-controlled study. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 21, p. 8, 2007.

MIRANDA, M.; BOTTI, D. Harding-Passey Mouse-Melanoma Tyrosinase Inactivation by Reaction-Products and Activation by L-Epinephrine. **General Pharmacology**, v. 14, n. 2, p. 231-237, 1983. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <Go to ISI>://A1983QH22500002 >.

MONTEIRO, V. F. F. M., L.; VIEIRA, I. J. C.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, RAHMAN, R. L. A. Phenylated coumarins chalcone and new cinnamic acid and dihydroxinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal Brazilians Chemica**, v. 13, p. 6, 2002.

NAUGHTON, G. K.; REGGIARDO, D.; BYSTRYN, J. C. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v. 15, n. 5 Pt 1, p. 978-81, Nov 1986. ISSN 0190-9622 (Print) 0190-9622.

NELHAUS, G. Acquired unilateral vitiligo and poliosis of the head and subacute encephalitis with partial recovery. **Neurology**, v. 20, n. 10, p. 965-74, Oct 1970. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878.

NJOO, M. D. et al. Association of the Kobner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. **Arch Dermatol**, v. 135, n. 4, p. 407-13, Apr 1999. ISSN 0003-987X (Print) 0003-987x.

NJOO, M. D. et al. Nonsurgical repigmentation therapies in vitiligo - Meta-analysis of the literature. **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 12, p. 1532-1540, Dec 1998. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <Go to ISI>://000077622100006 >.

NORDLUND, J. The epidemiology and genetics of vitiligo. **Clinics in Dermatology**, v. 15, n. 6, p. 875-878, Nov-Dec 1997. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997YJ79800008 >.

ONGENAE, K.; VAN GEEL, N.; NAEYAERT, J. M. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 2, p. 90-100, Apr 2003. ISSN 0893-5785 (Print) 0893-5785 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622785> >.

PARICHY, D. M.; REEDY, M. V.; ERICKSON, C. A. Regulation of Melanoblast Migration and Differentiation. In: (Ed.). **The Pigmentary System**: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p.108-139. ISBN 9780470987100.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **J Photochem Photobiol B**, v. 14, n. 1-2, p. 3-22, Jun 30 1992. ISSN 1011-1344 (Print) 1011-1344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1432383> >.

PEARS, J. S. et al. A case of skin hyperpigmentation due to α -MSH hypersecretion. **British Journal of Dermatology**, v. 126, n. 3, p. 286-289, 1992. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00660.x> >.

PROSE, J. S. B. N. S. Vitiligo in children: a review of classification, hypotheses of pathogenesis and treatment. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 6, p. 5, 2005.

REARDON, J. T. et al. Removal of psoralen monoadducts and crosslinks by human cell free extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 17, p. 4623-4629, 1991. ISSN 0305-1048 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328701/> >.

REES, J. L.; HEALY, E. Melanocortin receptors, red hair, and skin cancer. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Vol 2, No 1, August 1997**, p. 94-98, 1997. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997BJ37T00017 >.

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 21, n. 7, p. 865-76, Aug 2007. ISSN 0926-9959 (Print) 0926-9959.

RILEY, P. A. Mechanism of pigment-cell toxicity produced by hydroxyanisole. **J Pathol**, v. 101, n. 2, p. 163-9, Jun 1970. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417.

ROELANDTS, R. The history of phototherapy: something new under the sun? **J Am Acad Dermatol**, v. 46, n. 6, p. 926-30, Jun 2002. ISSN 0190-9622 (Print) 0190-9622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063493> >.

ROUZAUD, F. et al. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2, p. 133-152, 2005. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704004919> >.

RUSSELL, J. J. Topical tacrolimus: a new therapy for atopic dermatitis. **Am Fam Physician**, v. 66, n. 10, p. 1899-902, Nov 15 2002. ISSN 0002-838X (Print) 0002-838x.

SAGE, E.; DROBETSKY, E. A.; MOUSTACCHI, E. 8-Methoxypsoralen induced mutations are highly targeted at crosslinkable sites of photoaddition on the non-transcribed strand of a mammalian chromosomal gene. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 2, p. 397-402, 1993. ISSN 0261-4189 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413222/> >.

SARKAR, C. et al. Human placental protein/peptides stimulate melanin synthesis by enhancing tyrosinase gene expression. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 285, n. 1-2, p. 133-142, 2006/04/01 2006. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-005-9069-3> >.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? **Exp Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 139-40; discussion 141-60, Feb 2008. ISSN 0906-6705.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 315, n. 2, p. 502-8, Mar 5 2004. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

SCHAUER, E. et al. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. **J Clin Invest**, v. 93, n. 5, p. 2258-62, May 1994. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182158> >.

SCHMITT, I. M.; CHIMENTI, S.; GASPARRO, F. P. Psoralen-protein photochemistry — a forgotten field. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, n. 2, p. 101-107, 1995. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449407101S> >.

SCICCHITANO, D. A.; HANAWALT, P. C. Intragenomic repair heterogeneity of DNA damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 98, p. 45-51, 1992. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519617/> >.

SILVERBERG, N. B. Update on childhood vitiligo. **Curr Opin Pediatr**, v. 22, n. 4, p. 445-52, Aug 2010. ISSN 1531-698X (Electronic) 1040-8703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616733> >.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 3// 1988. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650> >.

SLOMINSKI, A. et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1155-228, Oct 2004. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383650> >.

STOKES, W. S.; SCHECHTMAN, L. M.; HILL, R. N. The interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the

ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). **ATLA. Alternatives to laboratory animals**, v. 30, p. 23-32, 2002. ISSN 0261-1929.

TAIEB, A. Intrinsic and extrinsic pathomechanisms in vitiligo. **Pigment Cell Res**, v. 13 Suppl 8, p. 41-7, 2000. ISSN 0893-5785 (Print) 0893-5785 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041356> >.

TAIEB, A. et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 1, p. 5-19, Jan 2013. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://000314469000034 >.

TAIEB, A. et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 1, p. 5-19, 2013. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11197.x> >.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. ISSN 1098-2280. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J) >.

VALLE, Y. et al. Multidisciplinary approach to R&D in vitiligo, a neglected skin disease. **Dermatologic Therapy**, v. 25, p. S1-S9, 2012. ISSN 1529-8019. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/dth.12009> >.

VOS, J. M.; WAUTHIER, E. L. Differential introduction of DNA damage and repair in mammalian genes transcribed by RNA polymerases I and II. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 4, p. 2245-2252, 1991. ISSN 0270-7306 1098-5549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC359922/> >.

WESTERHOF W, N.-K. L. M. P. H. G. E. J. LEft-right comparison study of the combination of fluticasone propionate and uv-a vs either fluticasone propionate or uv-a alone for the long-term treatment of vitiligo. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 9,

p. 1061-1066, 1999. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.135.9.1061> >.

WESTERHOF, W.; NIEUWEBOER-KROBOTOVA, L. Treatment of vitiligo with uv-b radiation vs topical psoralen plus uv-a. **Archives of Dermatology**, v. 133, n. 12, p. 1525-1528, 1997. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1997.03890480045006> >.

WHITTON, M. E. et al. Interventions for vitiligo. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD003263, 2010. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20091542> >.

WIKBERG, J. E. S. et al. New aspects on the melanocortins and their receptors. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 5, p. 393-420, Nov 2000. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <Go to ISI>://000090102500001 >.

YANG, X. Y. et al. 8-Methoxypsoralen-DNA adducts in patients treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 1, p. 59-63, Jan 1989. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2642513> >.