

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA GUIMARÃES MOREIRA

Avaliação pré-clínica do extrato hidroetanólico da
Pyrostegia venusta no tratamento do vitiligo

CURITIBA
2014

CAMILA GUIMARÃES MOREIRA

Avaliação pré-clínica do efeito do extrato hidroetanólico da
Pyrostegia venusta no tratamento do vitiligo

Tese desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Cabrini

CURITIBA
2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Moreira, Camila Guimarães

Avaliação pré-clínica do extrato hidroetanólico da *Pyrostegia venusta*
no tratamento do vitiligo. / Camila Guimarães Moreira. – Curitiba, 2014.
146f.: il. ; 30cm.

Orientador: Michel Fleith Otuki

Co-orientadora: Daniela Cabrini

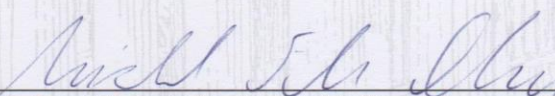
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Vitiligo. 2. Óleo de Cróton. 3. Plantas medicinais. I. Título II.
Otuki, Michel Fleith. III. Cabrini, Daniela. IV. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

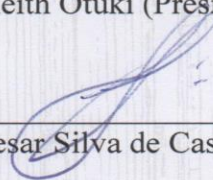
CDD (20. ed.) 615.1

1 **ATA DO JULGAMENTO DA 31ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

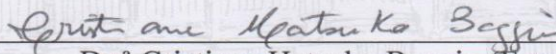
2 Ao quinto dia do mês de dezembro do ano de dois mil e quatorze, às nove horas, no
3 Auditório do Departamento de Farmacologia, Anexo I, do Setor de Ciências Biológicas da
4 Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado
5 do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda CAMILA
6 GUIMARÃES MOREIRA, intitulada “AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO DA
7 PYROSTEGIA VENUSTA NO VITILIGO”, sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith
8 Otuki e banca composta por: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente – Farmacologia –
9 UFPR), Prof. Dr. Caio Cesar Silva de Castro (Dermatologia – PUCPR), Dr.^a Cristiane
10 Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo (Biologia
11 Estrutural, Molecular e Genética – UEPG) e Prof.^a Dr.^a Irinéia Paulina Baretta (Inst. de
12 Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR). A Banca Examinadora iniciou os
13 trabalhos e a candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
14 sendo em seguida arguida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e
15 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão
16 Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovada. Para a publicação o
17 trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas que serão conferidas por seu orientador.
18 Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a
19 presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da Comissão
20 Examinadora, em Curitiba, 05 de dezembro de 2014.



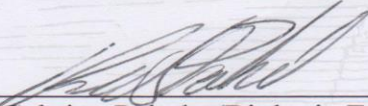
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente – Farmacologia – UFPR)



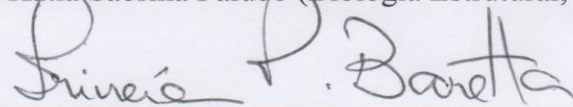
Prof. Dr. Caio Cesar Silva de Castro (Dermatologia – PUCPR)



Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR)



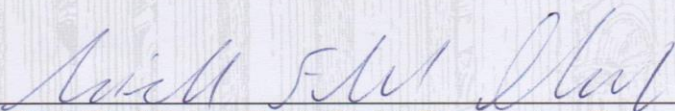
Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo (Biologia Estrutural, Molecular e Genética – UEPG)



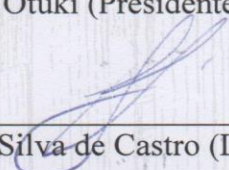
Prof.^a Dr.^a Irinéia Paulina Baretta (Inst. de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR)

PARECER

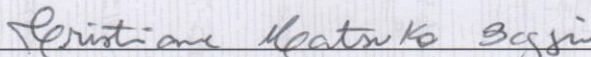
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO DA *Pyrostegia venusta* NO VITILIGO”, de autoria da pós-graduanda CAMILA GUIMARÃES MOREIRA, sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith Otuki e banca composta por: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente – Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Caio Cesar Silva de Castro (Dermatologia – PUCPR), Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo (Biologia Estrutural, Molecular e Genética – UEPG) e Prof.^a Dr.^a Irinéia Paulina Baretta (Inst. de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR)., reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 05 de dezembro de 2014.



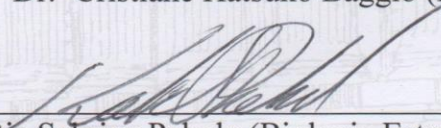
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente – Farmacologia – UFPR)



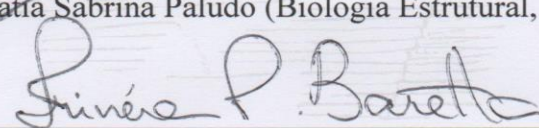
Prof. Dr. Caio Cesar Silva de Castro (Dermatologia – PUCPR)



Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR)



Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo (Biologia Estrutural, Molecular e Genética – UEPG)



Prof.^a Dr.^a Irinéia Paulina Baretta (Inst. de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – UNIPAR)

Aos meus pais Gilberto e Marcia, pelo amor, educação e por terem me ensinado tudo o que sei e sou.

Às minhas irmãs Priscilla e Paula por toda motivação e carinho.

Aos meus sobrinhos Arthur e Ethan, minhas maiores paixões.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Michel Fleith Otuki e Daniela de Almeida Cabrini pela oportunidade, ensinamentos e dedicação durante todo o período de trabalho, permitindo o aperfeiçoamento da minha vida profissional;

Aos meus amigos de laboratório Bruna, Cíntia, Daniel, Graziela, Luise, Stefanie e Priscila, por todos os momentos compartilhados, apoio científico, companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório;

À minha irmã Priscila Pawloski, não somente por sua amizade, dedicação e amor, mas principalmente por todos os momentos inesquecíveis que tivemos ao longo dessa jornada;

À minha grande amiga Cíntia Horinouchi, pela bela amizade construída e por ter me guiado com carinho e paciência. Grande parte do que sei devo a você;

À minha outra grande amiga Luise Blind Carrenho, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis de execução e conclusão desse trabalho. Sou muito grata por todo seu apoio;

À Bruna Soley, pelo apoio, auxílio no trabalho e por ter tornado os dias mais leves nos momentos estressantes;

Aos professores e colegas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por terem me acolhido e por confiarem em mim. Em especial aos professores Fábio André dos Santos, Michele Dietrich, Katia Paludo e aos alunos Andressa Schaia, Reila Mendes, Letícia Campos e Letícia Wambier. Nunca esquecerei o período que passei com vocês;

Aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por terem compartilhado parte do seu conhecimento;

Ao Herbarium Laboratório Botânico, pelo fornecimento de matérias-primas e apoio financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

“Desejo é a chave para a motivação;
mas é a determinação e o
comprometimento a uma implacável
busca dos seus objetivos - um
comprometimento com a excelência -
que irá possibilitar você a alcançar o
sucesso que você deseja.”

Mario Andretti

“Your first projects aren't the greatest
things in the world, and they may have
no money value, they may go nowhere,
but that is how you learn - you put so
much effort into making something right
if it is for yourself.”

Steve Wozniak

RESUMO

Pyrostegia venusta é uma planta nativa do Brasil com várias propriedades benéficas, incluindo tratamento do vitiligo. No entanto, seus efeitos no processo de melanogênese ou no vitiligo ainda não foram comprovados. Nesse estudo, o objetivo foi investigar o efeito melanogênico do extrato hidroetanólico proveniente das folhas da *P. venusta* (EHPV) e seu possível mecanismo de ação nas células da linhagem B16F10. Além disso, seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e hiperpigmentante em modelos animais usados para a pesquisa do vitiligo, através da aplicação de óleo de cróton (OC) e monobenzona. O EHPV foi testado em diferentes concentrações com o intuito de avaliar o conteúdo de melanina, viabilidade celular através dos métodos do vermelho neutro e MTT, bem como atividade da tirosinase *in vitro*. Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de preparações farmacêuticas tópicas e através da administração por via oral foram analisados em animais Swiss, através do modelo de edema de orelha induzido por OC, seguido da avaliação da espessura da orelha dos animais, atividades da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-b-D-glucosaminidase (NAG), infiltração celular, níveis de citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs). A alteração da pigmentação de animais da linhagem C57BL/6, infiltração celular e níveis de citocinas e EROs foram avaliadas no modelo de vitiligo induzido por monobenzona. Resultados *in vitro* mostraram que EHPV aumenta a produção de melanina em resposta a várias concentrações (0,1; 0,3; 1 e 3 µg/ml). No entanto, o mecanismo através do qual ocorre o aumento de melanina não é dependente da atividade da tirosinase *in vitro*. O modelo animal de edema induzido por óleo de cróton mostrou que o EHPV, quando administrado por via oral (300 mg/kg), reduz atividade da NAG. Além disso, reduziu o número de células infiltradas quando comparada com o grupo controle, bem como diminuiu níveis das citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O tratamento tópico do EHPV (10%) não alterou esses parâmetros citados; no entanto, diminuiu infiltração celular e níveis de EROs. Ambas as preparações aumentaram os níveis de melanina epidermal e pigmentação dermal; além de reduzirem níveis de citocinas e EROs. No entanto, somente o EHPV tópico alterou a marcação específica para melanina. Concluindo, o EHPV estimula a melanogênese celular em baixas concentrações em células B16F10. Além disso, pela primeira vez foram demonstrados efeitos anti-inflamatórios e hiperpigmentantes, confirmando diferentes efeitos tópico e sistêmico através dos modelos animais. Assim, esses resultados *in vivo* e *in vitro* evidenciam o uso da *P. venusta* no vitiligo.

Palavras-chave: *Pyrostegia venusta*; melanogênese; vitiligo; monobenzona; óleo de cróton; B16F10.

ABSTRACT

Pyrostegia venusta is a native Brazilian plant that has a variety of beneficial properties, including treatment of vitiligo. In this study we aim to investigate the melanogenic effect and the mechanism of the *P. venusta* leaves (EHPV) extract in B16F10 cells, as well as the its antiinflammatory, antioxidant and hyperpigmentant activities in animal models of vitiligo induced by croton oil and monobenzone. The EHPV was tested at different concentrations in the trials of melanin content, cell viability by the neutral red and MTT assays, and cellular tyrosinase activity in order to examine the effects on melanogenesis in murine B16F10 murine cells. The antiinflammatory and antioxidant effects of topical and oral administration of EHPV were evaluated in Swiss mice on oedema model induced by croton oil. It was then assessed the myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG) activities, cell infiltration, cytokine and reactive species oxygen (ROS) levels. The involvement on mice pigmentation, cell infiltration and cytokine levels were evaluated on vitiligo model induced by monobenzone. *In vitro* studies showed that EHPV increased melanin content in response to several concentrations (0.1; 0.3; 1 and 3 µg/ml). However, the mechanism by which this increase occurred is not dependent on the activity of tyrosinase. *In vivo* assessment, on mouse ear oedema induced on Swiss mice, EHPV when given orally (300 mg/kg) significantly reduced NAG activity. The same way, cell infiltration was low when compared to control group, as well as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels. Topical treatment with EHPV (10%) did not caused alterations on NAG activity and cytokines content, but diminished cell infiltration and ROS levels. Both preparations enhanced epidermal melanin level and dermal pigmentation, while they diminished the amount of inflammatory cytokines and cell infiltration. However, only the topic EHPV changed the melanin specifically labeled. In conclusion, the EHPV stimulates cell melanogenesis in B16F10 cells at low concentrations. Also, for the first time we have demonstrated anti-inflammatory and hiperpigmentantes effects of *P. venusta*, indicating different topical and systemic properties, in two models that mimic several features encountered in vitiligo. Thus, these results support the use of *P. venusta* in vitiligo.

Key-words: *Pyrostegia venusta*; melanogenesis; vitiligo; monobenzone; croton oil; B16F10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da epiderme	19
Figura 2. Vias de síntese da melanina.....	20
Figura 3. Transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos	21
Figura 4. Tipos de vitiligo: Não -segmentar (esq.) e segmentar (dir.)	27
Figura 5. Interação entre as principais hipóteses da patogênese do vitiligo.....	31
Figura 6. Folhas e flores da <i>P. venusta</i>	40
Figura 7. Hipótese do estudo	42
Figura 8. Delineamento experimental dos ensaios <i>in vitro</i>	48
Figura 9. Delineamento experimental do modelo de inflamação induzido por múltiplas aplicações de OC	50
Figura 10. Delineamento experimental do modelo de vitiligo induzido por múltiplas aplicações de monobenzona	53
Figura 11. Avaliação da viabilidade celular de B16F10 após exposição a diferentes concentrações do extrato HE de <i>P. venusta</i> por 24 h	59
Figura 12. Avaliação da viabilidade celular de B16F10 após exposição a diferentes concentrações do extrato HE de <i>P. venusta</i> por 96 h	61
Figura 13. Efeito dos HE das folhas de <i>P. venusta</i> no conteúdo de melanina na linhagem B16F10.....	63
Figura 14. Efeito do HE das folhas de <i>P. venusta</i> na atividade da enzima tirosinase.....	65
Figura 15. Avaliação do grau de genotoxicidade <i>in vitro</i> através do ensaio cometa	67
Figura 16. Avaliação da ação do HE da <i>P. venusta</i> na espessura da orelha de animais através da aplicação de óleo de cróton	68
Figura 17. Avaliação da ação do extrato HE de <i>P. venusta</i> em diferentes preparações farmacêuticas no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton	70
Figura 18. Avaliação da ação do extrato HE de <i>P. venusta</i> em diferentes preparações farmacêuticas na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no modelo agudo induzido por óleo de cróton	71

Figura 19. Efeitos do EHPV incorporado ao gel de natrosol no edema de orelha e atividades enzimáticas induzidos pela múltipla aplicação de óleo de cróton	73
Figura 20. Efeitos do EHPV incorporado ao creme não-iônico no edema de orelha e atividades enzimáticas induzidos pela múltipla aplicação de óleo de cróton	74
Figura 21. Efeitos do EHPV administrado por via oral no edema de orelha e atividades enzimáticas induzidos pela múltipla aplicação de óleo de cróton	75
Figura 22. Efeito da <i>P. venusta</i> aplicada topicamente no infiltrado celular no modelo do óleo de cróton	77
Figura 23. Efeito da <i>P. venusta</i> administrada por via oral no infiltrado celular no modelo do óleo de cróton	78
Figura 24. Avaliação dos níveis de citocinas nos animais submetidos ao modelo do óleo de cróton.....	80
Figura 25. Avaliação das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos animais submetidos ao modelo de múltiplas aplicações de óleo de cróton.....	80
Figura 26. Determinação do efeito despigmentante induzido pelo modelo da monobenzona em camundongos e ação da <i>P. venusta</i> sobre esse modelo	82
Figura 27. Efeitos nos níveis da melanina epidermal após tratamento com <i>P. venusta</i> no modelo da monobenzona.....	85
Figura 28. Efeitos na despigmentação dermal após tratamento com <i>P. venusta</i> no modelo da monobenzona.....	86
Figura 29. Avaliação das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos animais submetidos ao modelo do vitiligo.....	88
Figura 30. Níveis de citocinas avaliadas no dorso de animais induzidos por monobenzona.....	90
Figura 31. Níveis de citocinas avaliadas na orelha de animais induzidos por monobenzona.....	91
Figura 32. Avaliação histológica do infiltrado celular através da coloração de hematoxilina-eosina em animais submetidos ao modelo da monobenzona.....	94

Figura 33. Avaliação histológica após marcação de melanina por coloração de Fontana-Masson.....	95
Figura 34. Avaliação do peso dos animais no modelo de vitiligo induzido por monobenzona e tratado com <i>P. venusta</i>	97
Figura 35. Avaliação do peso de órgãos dos animais no modelo de vitiligo induzido por monobenzona e tratado com <i>P. venusta</i>	98
Figura 36. Avaliação morfológica de órgãos dos animais no modelo de vitiligo induzido por monobenzona e tratado com <i>P. venusta</i>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação do efeito despigmentante induzido pelo modelo da monobenzona em camundongos e ação da *P. venusta* sobre esse modelo..... 83

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos com o tratamento com do EHPV nos modelos induzidos por óleo de cróton 100

Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos com o tratamento com do EHPV no modelo induzidos por modelo da monobenzona 101

LISTA DE ABREVIATURAS

6-BH₄: tetrahidrobiopterina
AChE: acetilcolinesterase
ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA: Análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA: albumina de soro bovino
COX: cicloxigenase
DAMPs: padrões moleculares associados ao dano
DCFH: 2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DMEM: meio Dulbecco MEM
DMSO: dimetilsulfóxido
EHPV: extrato hidroetanólico de *Pyrostegia venusta*
EPM: erro padrão da média
EROs: espécies reativas de oxigênio
FGF: fator de crescimento de fibroblasto
FKBP: proteína intracelular macrofilina-12
gp-100: proteína de matriz melanossomal
GR: receptor de glicocorticóide
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HE: hematoxilina-eosina
HSP-70: heat shock protein-70
HTAB: hexadeciltrimetilamônio
IgG: imunoglobulina G
IFN- γ : interferon- γ
IL: interleucina
LOX: lipoxigenase
MAO: monoaminoxidase
MBZ: monobenzona
MITF: fator de transcrição associado à microftalmia

MPO: mieloperoxidase
MSH: hormônio melanócito-estimulante
MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAG: n-acetil- β -D glucosaminidase
NaOH: hidróxido de sódio
NB-UVB: radiação UVB de baixo espectro
NF- κ B: fator nuclear kappa B
NK: natural killer
OC: óleo de cróton
p53: supressor tumoral
PGE₂: prostaglandina E₂
PKC: proteína quinase C
PLA₂: fosfolipase A₂
PRRs: receptores de reconhecimento de padrão inato
PUVA: psoraleno + UVA
SCF: stem cell factor
SFB: soro fetal bovino
TCR: camundongos transgênicos para o receptor de células T
TGF: fator de crescimento transformante
Th: T helper
TMB: tetrametilbenzidina
TNF: fator de necrose tumoral
TPA: 12-O-tetradecanoilforbol acetato
Treg: células T regulatórias
TRP-1: proteína 1 relacionada à tirosinase
TRP-2: proteína 2 relacionada à tirosinase
UV: radiação ultravioleta
UVB-NB: radiação UVB de baixo espectro
VN: vermelho neutro
VNS: vitiligo não-segmentado
VS: vitiligo segmentado

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1. A pele e o processo de melanogênese	18
1.2. Distúrbios de pigmentação	23
1.3. Vitiligo	24
1.3.1. Definição.....	24
1.3.2. Dados epidemiológicos e etiologia	24
1.3.3. Classificação.....	25
1.3.4. Patogênese	27
1.3.5. Diagnóstico	31
1.3.6. Tratamentos.....	32
1.3.7. Modelos de estudo na pesquisa pré-clínica do vitiligo.....	34
1.4. Plantas medicinais e vitiligo	37
1.5. <i>Pyrostegia venusta</i>	39
2.JUSTIFICATIVA	41
3.HIPÓTESE	42
4.OBJETIVOS	43
4.1. Objetivo geral	43
4.2. Objetivos específicos.....	43
5.MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1. Drogas e reagentes	44
5.2. Coleta e identificação botânica	44
5.3. Obtenção do extrato bruto	44
5.4. Cultivo celular	45
5.5. Ensaio de viabilidade celular	45
5.5.1. Vermelho neutro	45
5.5.2. MTT	45
5.6. Quantificação do conteúdo de melanina.....	46
5.7. Atividade enzimática da tirosinase.....	46
5.8. Genotoxicidade <i>invitro</i>	47
5.9. Animais.....	48

5.10. Modelo de edema de orelha	48
5.10.1. Avaliação do edema agudo induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton (OC).....	49
5.10.2. Edema de orelha crônico induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	49
5.11. Avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).....	50
5.12. Avaliação da atividade enzimática da <i>n-acetil-B-d</i> glucosaminidase (NAG)	51
5.13. Análise histológica	52
5.14. Modelo animal de vitiligo induzido pela aplicação repetida de monobenzona	52
5.15. Determinação do escore e disseminação de vitiligo	54
5.16. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tecidos	54
5.17. Determinação dos níveis de citocinas	54
5.18. Determinação dos níveis epidermais de melanina	55
5.19. Determinação da pigmentação da derme	56
5.20. Coloração de Fontana-Masson	56
5.21. Análise estatística.....	56
6.RESULTADOS	58
6.1. Avaliações <i>in vitro</i>	58
6.1.1. Avaliação da viabilidade celular	58
6.1.2. Avaliação do efeito do EHPV no conteúdo de melanina.....	62
6.1.3. Avaliação da ação do EHPV na atividade da tirosinase <i>in vitro</i>	64
6.1.4. Avaliação do possível dano no DNA causado pelo EHPV <i>in vitro</i>	66
6.2. Avaliações <i>in vivo</i>	68
6.2.1. Verificação dos efeitos de preparações farmacêuticas contendo EHPV em parâmetros inflamatórios induzidos no modelo agudo de edema de orelha em camundongos.....	68
6.2.2. Verificação dos efeitos de preparações farmacêuticas contendo EHPV em parâmetros inflamatórios induzidos por múltiplas aplicações de óleo de cróton em camundongos.....	72
6.2.3. Verificação do efeito de preparações farmacêuticas contendo EHPV em parâmetros induzidos por múltiplas aplicações de monobenzona (modelo de vitiligo) em camundongos.....	82
6.2.4. Avaliação de possíveis efeitos adversos no modelo de vitiligo.....	96
7.DISSCUSSÃO	102
8.CONCLUSÃO	127

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A pele e o processo de melanogênese

A pele é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. Constitui-se em uma complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, de maneira harmônica, ao desempenho de suas funções. Por ser a primeira barreira em contato com o meio externo, é constantemente sujeita a lesões e invasão de patógenos que podem gerar diversas doenças inflamatórias. Desta forma, possui um papel importante na manutenção e desenvolvimento da defesa (BOUWSTRA; PONEC, 2006).

A pele compõe-se, essencialmente, de três camadas: uma camada superior - a epiderme; uma camada intermediária - a derme (ou cório); e uma camada profunda - a hipoderme (ou tecido subcutâneo). A derme é a camada que compreende os folículos capilares, nervos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Já a epiderme é a camada mais externa e desempenha um importante papel na resistência a agressões ambientais, tais como agentes infecciosos, agentes químicos e radiação ultravioleta (UV) (D'ORAZIO *et al.*, 2013).

A epiderme é subdividida em quatro camadas (Figura 1), cada uma com funções distintas. O estrato córneo é a camada mais externa e atua como uma barreira contra a penetração de organismos externos e toxinas, bem como a prevenção contra a perda de água. No estrato granuloso, inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose, diferenciando-se em corneócitos. No estrato espinhoso, os queratinócitos presentes são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina, e, por fim, a camada ou estrato basal, que é a camada mais profunda e responsável pela pigmentação, proliferação celular e renovação cutânea (BOUWSTRA *et al.*, 2003). Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13% de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel, as quais atuam nas respostas de defesa (PROST-SQUARCIONI, 2006; TAY *et al.*, 2014).

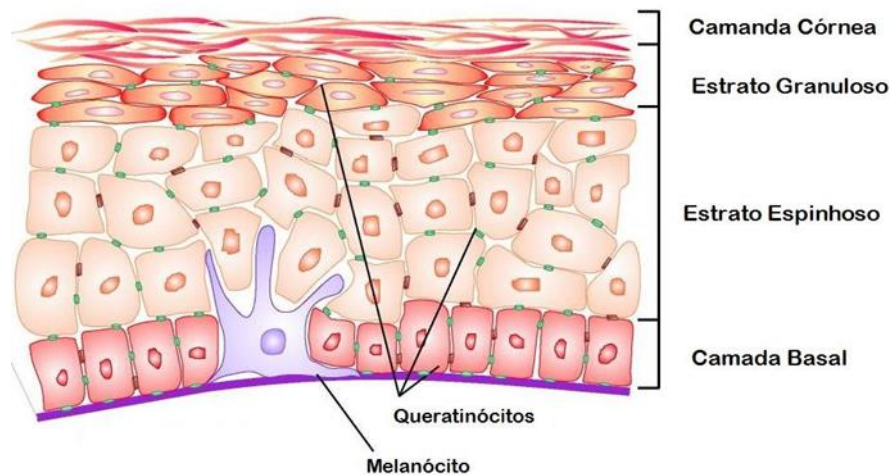


Figura 1: Camadas da epiderme.

Fonte: Adaptado de (KERN *et al.*, 2011).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda pronta e efetivamente frente a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação UV e extremos de temperatura. Dessa forma, há a manutenção da homeostasia cutânea. E nesse contexto, a pele demonstra ser muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas sim, indubitavelmente, também uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS; KUPPER, 1996; TAY *et al.*, 2014).

Para uma barreira física altamente eficaz, os queratinócitos acumulam pigmentos de melanina à medida que amadurecem, porém a síntese de melanina não ocorre nessas células e sim, nos melanócitos. Esses são células dendríticas derivadas da crista neural que possuem estruturas complexas compostas principalmente de proteínas e diversos sistemas de oxidase (ROY, 2007). Os melanócitos podem ser encontrados tanto na derme como na epiderme, sendo que melanócitos epidérmicos são geralmente encontrados na camada basal e também encontrados em folículos pilosos (D'ORAZIO *et al.*, 2013). Sua maior função é a síntese de melanina, um heteropolímero pigmentado sintetizado em organelas denominadas melanossomos (PARK *et al.*, 2009).

A melanina é constituída por subunidades de diferentes espécies de pigmentos formados pela oxidação e ciclização do aminoácido tirosina (Figura 2). A melanina existe em duas formas químicas principais: (1) eumelanina, um pigmento escuro expresso abundantemente na pele de indivíduos fortemente pigmentados, e (2) a feomelanina, um pigmento sulfatado de cor clara resultante da incorporação de cisteínas em precursores de melanina. Os níveis feomelanina são semelhantes entre indivíduos de pele escura e de pele clara, e a eumelanina é que apresenta variação entre os indivíduos, sendo determinante na tez da pele, sensibilidade à radiação UV e o risco de câncer de pele (D'ORAZIO *et al.*, 2013).

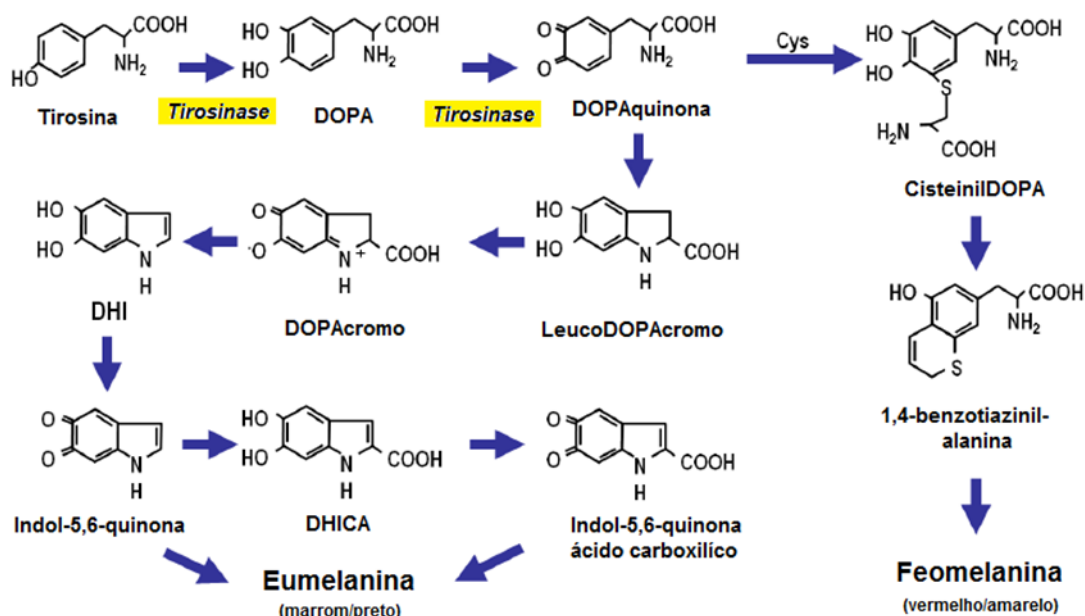


Figura 2: Vias de síntese da melanina.

Fonte: Adaptado de (D'ORAZIO *et al.*, 2013).

Os pigmentos produzidos pelos melanócitos são transferidos para os queratinócitos adjacentes dentro dos melanossomos através das extensões dendríticas (Figura 3). Cada melanócito pode estar em contato íntimo com até trinta e seis queratinócitos vizinhos, formando a unidade melano-epidérmica. Dentro dos queratinócitos, a melanina é preferencialmente localizada logo acima do núcleo, formando uma barreira protetora conhecida como cápsula

supranuclear, orientada de tal forma a proteger o DNA nuclear da radiação UV (PLONKA *et al.*, 2009; FELLER *et al.*, 2014).

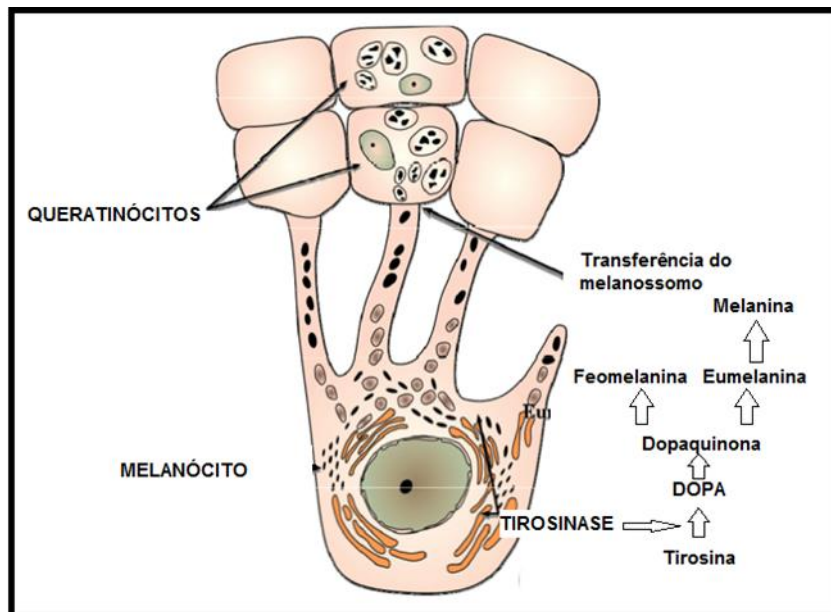


Figura 3: Transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos.

Fonte: Adaptado de (KERN *et al.*, 2011).

Além dessa importante função, a melanina pode ter muitas outras ações fisiológicas importantes: regulação da homeostase epidérmica, eliminação de radicais livres para proteger contra danos oxidativos, e, possivelmente, atividade antimicrobiana (D'ORAZIO *et al.*, 2013; FELLER *et al.*, 2014).

Na epiderme, a síntese e distribuição da melanina envolvem vários passos: transcrição de proteínas melanogênicas, biogênese de melanossomo, triagem de proteínas melanogênicas dentro dos melanossomos, transporte de melanossomos para os dendritos de melanócitos e, finalmente, transferência para os queratinócitos. Estes eventos são regulados por uma variedade de fatores parácrinos e autócrinos em resposta a estímulos endógenos e exógenos, principalmente radiação UV (PARK *et al.*, 2009).

Os melanossomos possuem todas as proteínas e enzimas necessárias para a biossíntese da melanina, manutenção da estrutura do melanossomo, e a maturação dos melanossomos em uma série de estágios, os quais podem ser

desprovidos de melanina (estágio I) até organelas listradas repletas de melanina (estágio IV) (MIOT *et al.*, 2009).

O comportamento do melanócito na pele é largamente influenciado por sinais positivos e negativos dos queratinócitos vizinhos e, em um grau menor, pelos fibroblastos da derme, bem como por sinais autócrinos e fatores ambientais, como a radiação UV (PARK *et al.*, 2009). Inúmeros fatores produzidos e liberados pelas células da pele podem estar envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação de melanócitos da epiderme de mamíferos, bem como na regulação da produção de melanina (HIROBE, 2005).

Dentre as proteínas essenciais para a produção de melanina, a que merece mais destaque é a tirosinase, uma glicoproteína localizada na membrana do melanossomo. Possui um domínio interno melanossomal que contém uma região catalítica (aproximadamente 90% da enzima), seguido por um pequeno domínio transmembrana e um citoplasmático de aproximadamente 30 aminoácidos. Resíduos de histidina presentes na porção catalítica da tirosinase se ligam a íons cobre que são necessários para a atividade da tirosinase. A proteína quinase C- β (PKC- β) fosforila dois resíduos de serina no domínio citoplasmático, uma modificação necessária para a ativação da tirosinase (PARK *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2009). Quando ativada, catalisa o passo inicial e limitante da síntese de melanina, a hidroxilação de L-tirosina em L-DOPA, e posteriormente oxida L-DOPA em DOPA-quinona (CHAWLA *et al.*, 2008).

Além disso, proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1) e proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP-2) são estruturalmente relacionadas à tirosinase, residem no interior dos melanossomas e, como a tirosinase, alcançam a membrana melanossomal. Suas funções ainda não estão bem esclarecidas, mas, como TRP-1 forma um complexo com a tirosinase, é possível que desempenhe um papel na ativação e/ou estabilização da tirosinase. Também tem uma função na biogênese do melanossomo, uma vez que a supressão da expressão de TRP-1 é associada com estruturas de melanossomo anormais. TRP-2 complexa-se com tirosinase e também com TRP-1. Atua em um dos estágios mais tardios de conversões na biosíntese de melanina (PARK *et al.*, 2009).

O fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) é um fator de transcrição que regula a transcrição de tirosinase, TRP-1, TRP-2 e PKC- β . Possui um papel central na síntese de melanina, bem como na biogênese e transporte de melanossomos (PARK *et al.*, 2009). MITF pode ser regulado por fatores ambientais, como radiação UV, por fatores derivados de queratinócitos, fibroblastos e outras células. Controla a diferenciação, dendricidade, a proliferação e apoptose através de várias vias e mecanismos. As três enzimas melanogênicas (tirosinase, TRP-1 e TRP-2) desempenham um papel chave na melanogênese e são alvos transcricionais de MITF, como muitas outras proteínas específicas do melanócito (LEVY *et al.*, 2006; D'ORAZIO *et al.*, 2013).

1.2 Distúrbios de pigmentação

Mudanças anormais da coloração da pele são observadas em um grande número de doenças, cada qual com seu mecanismo. Qualquer mudança dos componentes que contribuem ou regulam uma coloração normal resulta no excesso ou escassez de produção de melanina pela pele (DESSINIOTI *et al.*, 2009).

Alterações na produção de melanina final são largamente divididas em hipermelanóticas (excesso de melanina com população de melanócitos normal) e hipermelanocítica (melanina normal, com proliferação aumentada de melanócitos), bem como hipomelanótica / amelanótica e hipomelanocítica / amelanocítica (DESSINIOTI *et al.*, 2009). Estas estão relacionadas com doenças genéticas ou adquiridas, manifestadas localmente ou de forma difusa (FISTAROL; ITIN, 2010).

Estas alterações da pigmentação podem ser resultado de anormalidades na migração dos melanócitos da crista neural para a pele durante a embriogênese. Além disso, também podem ser decorrentes de um prejuízo na transferência de melanossomos para queratinócitos vizinhos, alterações na síntese de melanina e degradação ou eliminação defeituosas de melanina. A destruição dos melanócitos mediada pelo sistema imunológico ou toxinas também podem resultar em doenças de pigmentação (FISTAROL; ITIN, 2010).

Mais de cem genes estão envolvidos no processo de melanogênese, codificando importantes proteínas estruturais, enzimáticas e regulatórias. Alterações na transcrição, translação, processo ou tráfego intracelular de alguns destes genes/proteínas podem afetar a síntese de melanina. Além disso, a transferência de melanosomas dos melanócitos para os queratinócitos e sua quebra nos queratinócitos são processos que desempenham papéis importantes na regulação da pigmentação na pele e cabelo (DESSINIOTI *et al.*, 2009).

Dentre as doenças que geram despigmentação de pele, podemos destacar: hipomelanose pós-inflamatória, pitíriase alba, piebaldismo e, a mais comum, vitiligo (NICOLAIDOU; KATSAMBAS, 2014).

1.3 Vitiligo

1.3.1 Definição

Vitiligo é uma doença adquirida, de cunho crônico e sistêmico, com um curso clínico imprevisível. É principalmente caracterizado pelo aparecimento de máculas acrômicas ou hipocrômicas na pele e membranas mucosas, devido ao desaparecimento de melanócitos na área afetada. Sua repigmentação é incomum. As lesões variam no formato e tamanho, mas podem surgir em qualquer área da pele (TARLE *et al.*, 2014).

As lesões dos pacientes apresentam prurido, têm maior propensão a queimaduras solares e o surgimento do fenômeno de Köebner é comum (ALIKHAN *et al.*, 2011). Esse fenômeno nada mais é do que o aparecimento das lesões após um trauma agudo ou crônico. Foi mostrado, em um estudo com caucasianos, estar presente em até 31% dos pacientes com vitiligo comum (NJOO *et al.*, 1999). Os pacientes possuem um conhecimento pobre a respeito da sua situação: muitos deles acreditam que sua doença é causada por baixa assistência médica, comportamento pessoal, alimentação e até mesmo por causa da poluição (FIROOZ *et al.*, 2004).

1.3.2 Dados epidemiológicos e etiologia

Acredita-se que o vitiligo acometa até 2% da população mundial, com distribuição igual entre os gêneros e atingindo todas as idades (KRUGER; SCHALLREUTER, 2012). A idade média do início da doença varia dependendo da região geográfica (MAJUMDER *et al.*, 1993); no Brasil, a média é de 24 anos (TARLE *et al.*, 2014).

Ainda não está claro o que causa a perda de melanócitos e seu subsequente desaparecimento na pele afetada (ALIKHAN *et al.*, 2011), mas definitivamente o componente genético não pode ser descartado na etiologia da doença (TARLE *et al.*, 2014) visto que há envolvimento de fatores genéticos na susceptibilidade do vitiligo, demonstrado em estudos com pacientes da mesma família. Assim, o vitiligo segrega um padrão complexo de herança multifatorial e poligênico (MAJUMDER *et al.*, 1993).

Estudos genéticos epidemiológicos têm demonstrado que o vitiligo pode ser uma doença genética complexa. Isso pode ser afirmado através de trabalhos que mostraram que há variação na severidade de sintomas e idade de início, o que dificulta a definição de um fenótipo adequado e da seleção da população amostral; no entanto, a idade de início precoce está associada à ocorrência do vitiligo generalizado familiar (ALKHATEEB *et al.*, 2003; LABERGE *et al.*, 2005) e com casos mais severos da doença (ALKHATEEB *et al.*, 2003).

1.3.3 Classificação

O vitiligo pode ser dividido conforme suas manifestações clínicas (Fig. 4) em: vitiligo não-segmentar, segmentar e indeterminado (EZZEDINE *et al.*, 2012).

- *Vitiligo não-segmentar (VNS)*: é o tipo mais comum, com início gradual, máculas despigmentadas evoluindo quase sempre para manchas bem demarcadas, com suas bordas convexas ou recortadas. Sua distribuição é, geralmente, simétrica com alguns locais de predileção (GLASSMAN, 2011).
 - a) acrofacial: pode afetar face, cabeça, mãos e pés. Preferencialmente envolve a região perioral e extremidade dos dedos.

- b) mucosa: regiões de mucosa oral e genital são atingidas. Áreas da mucosa também podem ser afetadas em pacientes com as formas acrofacial, comum ou universal. Quando somente uma área da mucosa é atingida, classifica-se como indeterminado.
- c) generalizada/comum: as máculas são, com frequência, simétricas; pode afetar qualquer parte do tegumento, principalmente mãos, dedos, face e áreas expostas a trauma.
- d) universal: é a forma que afeta a maior extensão do tegumento (80 a 90% da superfície corporal). A forma generalizada/comum normalmente precede a universal.
- e) Mista: quando ocorre o aparecimento concomitante da forma segmentada e não-segmentada. Normalmente, a forma segmentada precede a não-segmentada.
- f) formas raras: vitiligo punctata, minor e folicular. Também são considerados inclassificáveis (FARIA *et al.*, 2014; TARLE *et al.*, 2014).
- *Vitiligo segmentar (VS)*: início geralmente precoce, evolução unilateral, com distribuição de dermatoma, sugerindo envolvimento neural ou uma forma de mosaicismo genético. Tende a ser estável após o desenvolvimento total. A área de despigmentação pode, em alguns casos, não ser bem delimitada (HANN; LEE, 1996; GLASSMAN, 2011). Pode afetar um, dois ou múltiplos segmentos. A forma unisegmentar é a mais comum e consiste de uma ou mais máculas em um lado do corpo, normalmente respeitando a linha média corporal e também há envolvimento dos pelos/cabelos corporais (leucotriquia), além de início rápido. Com menos frequência pode afetar dois ou mais segmentos. Pode até mesmo ter distribuição segmentar bilateral, iniciando de forma simultânea ou não.
 - *Formas sem classificação ou indeterminadas*
 - a) focal: mácula branca isolada sem distribuição segmentar; podendo ou não evoluir para formas segmentares ou não segmentares.
 - b) Mucosa: quando somente uma mucosa é afetada.



Figura 4: Tipos de vitiligo: Não-segmentar (esq.) e segmentar (dir.).
(EZZEDINE *et al.*, 2012).

1.3.4 Patogênese

Apesar do progresso principalmente nas áreas de genética e biologia molecular, ainda não existe uma hipótese universalmente aceita. A mais aceita atualmente é a hipótese autoimune (SCHALLREUTER; BAHADORAN; *et al.*, 2008; SANDOVAL-CRUZ *et al.*, 2011); no entanto, outras são propostas como: defeito na adesão epidermal, alterações bioquímicas e neurais, estresse oxidativo, entre outras. As teorias dominantes descrevem o processo imune ocorrendo em um organismo geneticamente susceptível e desencadeado por uma série de fatores do organismo e do ambiente (MILLINGTON; LEVELL, 2007). Parece que o vitiligo representa uma síndrome ao invés de uma doença, com diferentes, mas não mutuamente exclusivas, vias que levariam à falha ou desaparecimento dos melanócitos (GLASSMAN, 2011).

Os genes parecem desempenhar um papel em todos os aspectos da patogênese do vitiligo. Existe um histórico familiar positivo em cerca de 20%

dos casos. Envolve interação entre múltiplos genes com fatores não-genéticos, do ambiente e do próprio organismo (GLASSMAN, 2011).

- *Hipótese autoimune:*

A percepção que a autoimunidade estava envolvida em pacientes com vitiligo surgiu quando se percebeu que havia uma frequente co-ocorrência de doenças autoimunes nos pacientes e seus familiares, além de respostas favoráveis após terapia com imunossupressores (CLAYTON, 1977; SCHALLREUTER; LEMKE; *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1999; RADAKOVIC-FIJAN *et al.*, 2001; TARLE *et al.*, 2014). Algumas evidências confirmam e elegem como principal hipótese àquela envolvida diretamente com o sistema imune, entre elas: (i) vitiligo é acompanhado das imunidades humoral e celular anormais; (ii) altos níveis de auto-anticorpos circulantes encontrados em 5-10% dos pacientes, com predominância da classe da imunoglobulina G (IgG) e anticorpos anti-TRP-1 e anti-TRP-2 (KEMP *et al.*, 1997; KEMP *et al.*, 1998; 2001; KEMP *et al.*, 2002; LE POOLE; LUITEN, 2008; SCHALLREUTER; BAHADORAN; *et al.*, 2008); (iii) presença de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ na junção dermo-epidérmica na região peri-lesionada (STEITZ *et al.*, 2005; OYARBIDE-VALENCIA *et al.*, 2006); (iv) infiltração de células T CLA⁺ na pele peri-lesionada (ativação por células dendríticas) (VAN DEN WIJNGAARD *et al.*, 2000; LE POOLE *et al.*, 2004); (v) linfócitos T citotóxicos específicos a melanócitos estão associados com a atividade da doença (LANG *et al.*, 2001); (vi) baixos níveis da quimiocina CCL22, a qual aumenta a migração de Treg para o local injuriado (número insuficiente para suprimir a resposta citotóxica na pele de indivíduos afetados) (KLARQUIST *et al.*, 2010); (vii) diminuição de células T natural killer (NK) no sangue periférico (células regulatórias, responsivas pela resposta imune do tipo T helper 1 (Th1) /T helper 2 (Th2) que são diminuídas em outras doenças autoimunes, sugerindo um efeito protetor da sua parte) (ZHOU *et al.*, 2012).

- *Defeito na adesão epidermal/melanocitorragia:*

Acredita-se que defeitos na adesão estão envolvidos no desaparecimento de melanócitos nas lesões de pacientes com vitiligo. O sinal clínico que reforça essa teoria é a ocorrência do fenômeno Köebner (NJOO *et al.*, 1999). Estudos relacionados com essa teoria mostraram que: i) a proteína tenascina (relacionada com a adesão de melanócitos) está super-expressa em

pele lesionada quando comparada à pele saudável de pacientes (LIGHTNER; ERICKSON, 1990; LE POOLE *et al.*, 1997); ii) pacientes com vitiligo generalizado apresentam desaderência do melanócito após fricção da pele não afetada (GAUTHIER; CARIO-ANDRE; *et al.*, 2003). Essa observação leva à hipótese de que o vitiligo não-segmentar é uma doença melanocitorrágica com a perda aguda de melanócitos (início súbito), com resposta alterada dos melanócitos à fricção e outros tipos de estresse, os quais podem induzir desaderência celular e perda transepidermal.

Muitos autores adeptos a essa teoria especulam que fenômenos autoimunes podem ser engatilhados pela liberação de antígenos e reconhecimento dos melanócitos afetados por células dendríticas ou células T de memória durante a migração transepidermal, exacerbando, assim, a desaderência e perda de mais melanócitos (GAUTHIER; CARIO ANDRE; *et al.*, 2003; TARLE *et al.*, 2014).

- *Hipótese bioquímica:*

Essa hipótese se baseia no fato de que o vitiligo pode ser causa de uma disfunção na via metabólica, não necessariamente relacionada com os melanócitos, podendo levar à produção de metabólitos tóxicos como catecolaminas, quinonas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (DELL'ANNA; PICARDO, 2006; SCHALLREUTER; BAHADORAN; *et al.*, 2008).

- *Hipótese neural:*

A hipótese neural propõe que níveis elevados de alguns neurotransmissores e enzimas de degradação de catecolaminas danificam melanócitos. Os terminais axônicos e melanócitos epidermais fazem contato via sinapse química na pele humana, levando ao aumento da liberação de catecolaminas provenientes dos nervos autônomos no microambiente dos melanócitos em áreas vitiliginosas. Ainda, sabe-se que norepinefrina possui efeitos tóxicos diretos e indiretos nos melanócitos. Os efeitos diretos podem se resumir em inibição enzimática, desbalanço da recaptção de cálcio mitocondrial, formação de produtos citotóxicos, como EROs; já os indiretos são: vasoconstrição, com consequente formação de EROs e hipóxia; aumento da atividade de monoamino oxidase (MAO), a qual favorece a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (NAMAZI, 2005).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima importante na promoção e manutenção do estresse oxidativo, sendo encontrados níveis muito baixos nas lesões durante a despigmentação. Seus níveis retornam aos basais quando a pele danificada inicia a repigmentação (PICARDO *et al.*, 1994). Níveis de seus metabólitos são encontrados na urina de pacientes durante a fase ativa da doença (MORRONE *et al.*, 1992; CUCCHI *et al.*, 2003).

- *Hipótese relacionada com estresse oxidativo:*

O envolvimento do estresse oxidativo danificando os melanócitos é sugerido em vários estudos, os quais evidenciam um desbalanço entre sistemas oxidantes/antioxidantes na epiderme de pacientes com vitiligo. Dentre as evidências, podemos citar: i) aumento da sensibilidade de uma cultura de melanócitos ao estresse oxidativo (JIMBOW *et al.*, 2001); ii) acúmulo de concentração de peróxido de hidrogênio na epiderme de pacientes com vitiligo (SCHALLREUTER *et al.*, 1999); iii) aumento de monoaminoxidase-A (MAO-A) e da atividade de NADPH-oxidase, sendo capazes de aumentar peróxido de hidrogênio na epiderme (SCHALLREUTER; WOOD; PITTELKOW; *et al.*, 1994; SCHALLREUTER *et al.*, 1996; SCHALLREUTER *et al.*, 1999; HASSE *et al.*, 2004). O aumento da produção de tetrahydrobiopterina (6-BH₄) na epiderme de pacientes causa a inibição da enzima fenilalanina hidroxilase, responsável pela produção de L-tirosina a partir da L-fenilalanina, levando à diminuição de tirosina e, conseqüentemente, em alteração na síntese de melanina (SCHALLREUTER; WOOD; ZIEGLER; *et al.*, 1994).

Pacientes com vitiligo possuem baixos níveis ou baixa atividade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, como catalase, glutathione peroxidase e vitamina E, possivelmente aumentando a toxicidade de H₂O₂ (MARESCA *et al.*, 1997; PASSI *et al.*, 1998; SRAVANI *et al.*, 2009). Além disso, ocorre suspensão do processo de despigmentação e recuperação da cor da pele quando há remoção de H₂O₂ pela radiação UVB de baixo espectro (NB-UVB) ativando pseudocatalase (SCHALLREUTER *et al.*, 1999; TARLE *et al.*, 2014).

Assim, o vitiligo representa um padrão de reações complexas ou uma síndrome, envolvendo múltiplos fatores etiológicos, muitos deles atuando sinergicamente. Certamente a teoria genética, baseada na expressão de genes

que controlam todas outras hipóteses, também deve ser levada em consideração (SCHALLREUTER; BAHADORAN; *et al.*, 2008).

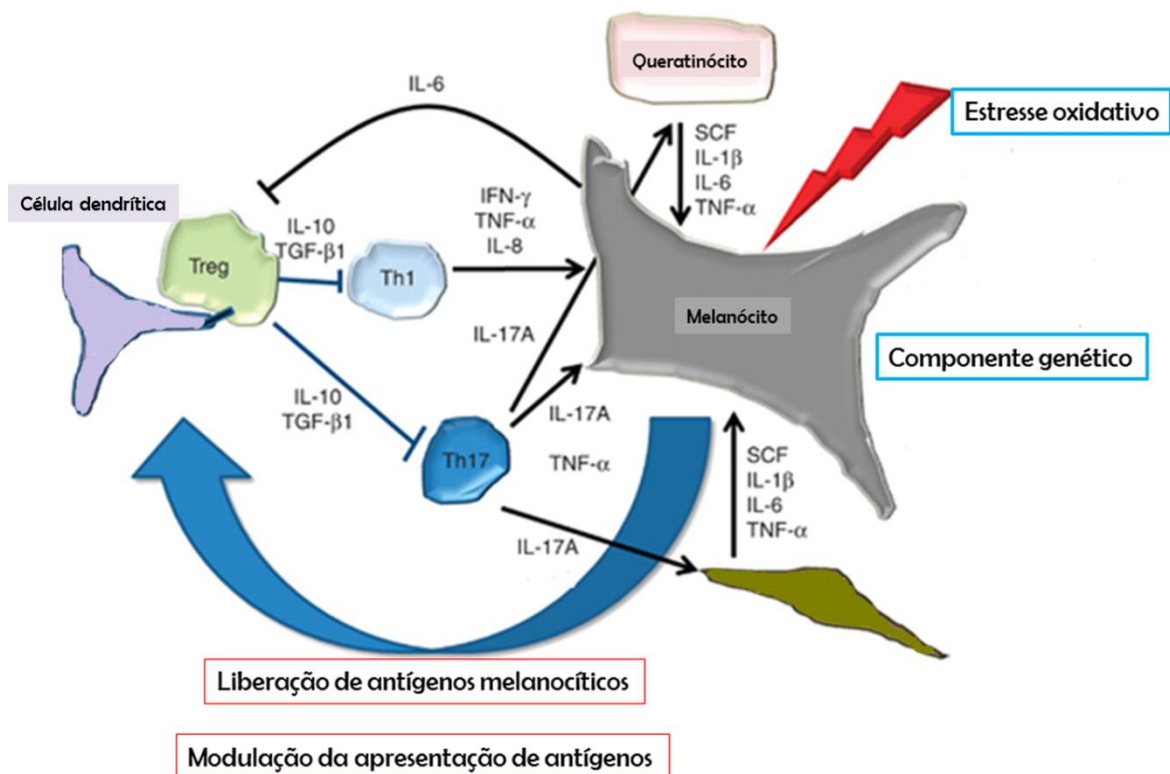


Figura 5: Interação entre as principais hipóteses da patogênese do vitiligo: Interação entre componentes do sistema imune/inflamatório e estresse oxidativo.

Fonte: Adaptado de (PASSERON; ORTONNE, 2012)

1.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico é clínico, mas ocasionalmente biópsias da pele são necessárias para a confirmação. Quando as lesões se encontram na fase inicial ou quando não há o diagnóstico, as secções de biópsias de pacientes podem ser coradas com hematoxilina-eosina, Fontana-Masson e/ou sujeitas à marcação para DOPA a fim de alcançar o diagnóstico conclusivo (KUMAR *et al.*, 2011). Exame das áreas afetadas com luz de Wood pode auxiliar para distinguir o vitiligo ativo de outras doenças caracterizadas por vários graus de hipopigmentação (KOPERA, 1997; ALIKHAN *et al.*, 2011).

1.3.6 Tratamentos

O principal objetivo das terapias atuais é estabilizar a despigmentação ou restabelecer a repigmentação das lesões de pacientes com vitiligo. Os corticoides tópicos, inibidores de calcineurina, fototerapia e fotoquimioterapia representam as opções terapêuticas de primeira linha, devido à sua eficácia e segurança. Já os análogos da vitamina D, corticoides orais e procedimentos cirúrgicos são considerados terapias de segunda linha. Outras terapias como os antioxidantes podem ser usadas com outras opções terapêuticas, enquanto que os agentes despigmentantes devem ser usados somente em casos de vitiligo extensivo (COLUCCI *et al.*, 2012).

Os corticoides tópicos de potência moderada são usados especialmente em crianças ou para a doença localizada (FERENCE; LAST, 2009). Seus efeitos são mediados via receptor de glicocorticoide (GR), gerando efeitos anti-inflamatórios/imunossupressores, metabólicos e tóxicos. Promovem mudanças na circulação/migração de leucócitos e alterações em funções específicas celulares, como inibição da síntese de citocinas e função de monócitos. Já os efeitos metabólicos e tóxicos são normalmente indesejados (SCHACKE *et al.*, 2002). Pacientes com vitiligo requerem períodos prolongados de uso, normalmente por períodos mais longos daqueles recomendados para dermatoses de cunho inflamatório. Isso resulta no surgimento de efeitos colaterais, limitando a terapia. Dentre eles, pode-se citar: atrofia cutânea, hipertricrose, hipopigmentação perilesional, etc. (GARG *et al.*, 2010).

Os inibidores de calcineurina de uso tópico (tacrolimo e pimecrolimo) são bastante utilizados na dermatologia. Seu mecanismo de ação se baseia na supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Isso ocorre no citoplasma das células-alvo, onde os inibidores de calcineurina se ligam à proteína intracelular macrofilina-12 (FKBP), suprimindo a atividade de calcineurina (dependente de cálcio e calmodulina). Seus efeitos anti-inflamatórios são devido à atividade T helper, afetando a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. O bloqueio da transcrição de citocinas leva à diminuição da expressão de citocinas dependentes de Th1 e Th2, entre elas, IL-2, 3, 4 e 5, IFN- γ e TNF- α ; entre outros efeitos (NGHIEM *et al.*, 2002; GISONDI *et al.*,

2005; GUTFREUND *et al.*, 2013). Sua atividade anti-inflamatória pode ser comparada a um corticoide de potência média.

A fototerapia é uma das formas mais antigas de se tratar pacientes com vitiligo e continua sendo o alicerce da terapia. A fotoquimioterapia com psoraleno tópico associado à radiação UVA (PUVA) é usada em pessoas com qualquer extensão de lesões. Os principais efeitos colaterais relatados são queimadura severa, formação de bolhas e repigmentação bastante escura, esta devido à descontrolada foto reação do psoraleno com radiação UVA na epiderme. Nos dias atuais, NB-UVB (311 nm) tem sido a fototerapia mais usada (ABDULLA; DESGROSEILLIERS, 2008; PERCIVALLE *et al.*, 2008).

Calcipotriol e tacalcitol são análogos da vitamina D, responsáveis pela modulação do cálcio. Melanócitos e queratinócitos provenientes da pele de pacientes com vitiligo possuem defeitos no transporte do cálcio (RODRIGUEZ-MARTIN *et al.*, 2009). Vitamina D3 parece ativar a síntese de melanina (BIRLEA *et al.*, 2009). Os estudos ainda são contraditórios, tanto quando usada como monoterapia, quanto quando associada com as fototerapias PUVA ou NB-UVB. O calcipotriol pode causar irritação na região lesionada e hipercalcemia se aplicada em quantidades maiores que as indicadas (GARG *et al.*, 2010).

Suplementação com antioxidantes tem se mostrado útil no tratamento do vitiligo. Pseudocatalase tópica é um complexo aplicado em toda a pele seguida da aplicação de baixas doses de UVB, funcionando como catalisador da reação de oxidação do H_2O_2 em O_2 e H_2O ; mimetizando a catalase natural (SCHALLREUTER; KRUGER; *et al.*, 2008; ELGOWEINI; NOUR EL DIN, 2009) Catalase de origem vegetal e vitamina E oral também estão sendo utilizadas, sozinhas ou em combinação com radiação UV (GLASSMAN, 2011).

As intervenções cirúrgicas são indicadas para pacientes com vitiligo estável não responsivo aos tratamentos convencionais. Esses procedimentos incluem técnicas de enxerto de células e tecidos. O objetivo das técnicas cirúrgicas é introduzir melanócitos nas regiões desprovidas de melanócitos, com lesões despigmentadas. Esse tratamento está entre os mais eficazes, mas é limitado devido a sua natureza invasiva, bem como por causa da necessidade de especialistas. A estabilidade da doença deve ser considerada, além do tipo de vitiligo e o tamanho das lesões (MULEKAR; ISEDEH, 2013).

Similar às intervenções cirúrgicas, a despigmentação deve ser considerada quando o vitiligo se torna resistente aos outros tratamentos. Além disso, é utilizada quando a extensão da despigmentação atinge grande parte do corpo. O potencial citotóxico dos agentes de primeira linha deve ser considerado. O agente despigmentante ideal deve ser potente, rápido e com efeito seletivo em melanócitos, levando à remoção permanente do pigmento, com o mínimo de efeitos colaterais. Os agentes despigmentantes mais utilizados são os fenóis, laser e crioterapia (GUPTA *et al.*, 2012).

1.3.7 Modelos de estudo na pesquisa pré-clínica do vitiligo

Somente uma abordagem multidisciplinar pode revelar a complexidade do vitiligo e sua farmacoterapia. A pesquisa atual engloba métodos imunológicos, histológicos e moleculares. As estratégias variam desde a análise da pele total até níveis celulares e moleculares, focando, principalmente, na descrição de alterações cutâneas (infiltrado de células envolvidas no sistema imune/inflamatório e características dos melanócitos remanescentes) (DELL'ANNA *et al.*, 2012).

Existem inúmeras opções metodológicas que são facilmente disponíveis e apropriadas para diferentes tipos de amostras. É possível obter informações a partir de (i) técnicas histológicas, imunofluorescentes e moleculares; (ii) testes funcionais através de cultivo em monocamada (melanócitos, queratinócitos e fibroblastos, puros ou misturados), direcionando à elucidação de características marcantes da patogênese; (iii) modelos de pele tridimensionais capazes de reproduzir a rede *in vivo*; (iv) ensaios bioquímicos (atividades enzimáticas, liberação de mediadores); (v) características funcionais de outros sistemas celulares (células do sangue periférico) avaliando defeitos não relacionados com melanogênese; (vi) simulação através de modelos computadorizados nos quais características funcionais e estruturais podem ser reproduzidas para definir a sequência de eventos que levariam ao defeito funcional (DELL'ANNA *et al.*, 2012).

Uma das vantagens da utilização de metodologias *in vitro* é analisar mudanças no microambiente, nos substratos e possíveis interações. Cultura de melanócitos e queratinócitos são usados como co-cultura, visto que os

queratinócitos também secretam muitos componentes que influenciam os melanócitos. Muitos modelos de pele equivalente têm sido usados principalmente na avaliação de compostos com potencial eficácia na regulação da pigmentação (KUMAR *et al.*, 2012).

No entanto, antes da verificação diretamente em humanos, provas de estudos e conceitos em modelo animal relevante são necessários.

Há alguns modelos animais que permitem o estudo tanto da patogênese do vitiligo quanto de novos agentes para o seu tratamento. Entre eles, podemos destacar: Modelo de galinha Smyth (estudos sobre o início e a progressão do vitiligo) (WANG; ERF, 2003); modelo de camundongos transgênicos para o receptor de células T (TCR) (respostas imunes efetoras) (MURANSKI *et al.*, 2008) e linhagem de camundongos FH (expressando células T CD8⁺ reativos para tirosinase) (GREGG *et al.*, 2010). Harris e cols. (2012) descreveram um novo modelo animal para o vitiligo, no qual os melanócitos são retidos nas áreas interfoliculares pelo aumento da expressão de uma forma mutante de ligante Kit (KITL ou SCF), e a perda de melanócitos é desencadeada pelo transplante de células T CD8⁺ tendo como alvo os melanócitos. Assim, o modelo de Harris recapitula a destruição autoimune dos melanócitos epidermais (HARRIS *et al.*, 2012).

Existem modelos usando a vacinação como estratégia, como, por exemplo, o modelo proposto por Denman e cols. (2008), no qual a TRP-2 humana e HSP-70 (derivada de humanos e camundongos) foram clonadas dentro de um vetor, desenvolvendo um modelo funcional de vitiligo autoimune. Esse modelo tem como objetivo avaliar a precipitação e expansão do vitiligo autoimune progressivo (DENMAN *et al.*, 2008).

Devido à transferência dos embriões, rápido desenvolvimento externo e facilidade de realizar análises genéticas, o zebrafish tem sido um bom modelo de vertebrado para estudar o desenvolvimento dos melanócitos (KELSH *et al.*, 1996), mesmo com as pequenas variações no desenvolvimento dessas células entre mamíferos e peixes (CHEN *et al.*, 2012).

Outro modelo que pode ser utilizado é o modelo do óleo de cróton, um agente flogístico que contém ésteres de forbol, principalmente o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Quando aplicado topicamente, o TPA causa uma reação inflamatória aguda, caracterizada por vasodilatação,

infiltração de leucócitos polimorfonucleares no tecido e formação de edema (STANLEY *et al.*, 1991). Todas essas características acontecem devido à ativação da proteína quinase C (PKC), a qual promove aumento da atividade de fosfolipase A₂ (PLA₂), resultando no aumento de níveis de ácido araquidônico e seus metabólitos, como prostaglandinas e leucotrienos (WANG *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2011). Além disso, PKC é responsável pela secreção e ativação de muitos mediadores imunes, como citocinas e quimiocinas, as quais aumentam e mantêm as respostas inflamatórias da pele (DENNING, 2004).

Além de atuar em parâmetros diretamente relacionados aos componentes imunes/inflamatórios da pele, o óleo de cróton também atua na formação da melanina. A via de sinalização dependente de PKC causa uma potente ativação de fosfolipase D, induzindo a supressão da melanogênese (CONRICODE *et al.*, 1992). Muito provavelmente porque a ativação de PKC resulta na diminuição da ligação do MITF à região do promotor da tirosinase (BERTOLOTTO *et al.*, 1998). Sob condições fisiológicas, o TPA pode utilizar outras vias de sinalização, como inibição da transcrição da tirosinase mediada por isoenzima convencional PKC e aumento da degradação de tirosinase mediada por PLA₂ (KAGEYAMA *et al.*, 2004). Além disso, em cultura celular, na presença de TPA, o número de dendritos dos melanócitos é diminuído; conseqüentemente, causa diminuição na habilidade dos melanócitos em transferir melanossomos para os queratinócitos vizinhos (NAKAZAWA *et al.*, 1993).

O modelo do vitiligo induzido pela monobenzona é um bom exemplo do sinergismo que ocorre entre mecanismos imunes, genéticos e relacionados ao estresse oxidativo, destruindo melanócitos (SCHALLREUTER; BAHADORAN; *et al.*, 2008) e levando à despigmentação vitiligo-*like* (VAN DEN BOORN *et al.*, 2011). A monobenzona, conhecida como monobenzil éter de hidroquinona (4-benziloxifenol ou p-benziloxifenol), foi utilizada no tratamento despigmentante de referência para pacientes com distúrbios de pigmentação como melasma, lentigines solares, nevus pigmentado e vitiligo (ALGHAMDI; KUMAR, 2011). É capaz de produzir significativa despigmentação cutânea em modelo com guinea pig (HARIHARAN *et al.*, 2010) e sua administração oral em animais de laboratório causa hipomelanose nos pelos (DENTON *et al.*, 1952). Ela pode

induzir morte celular através da desintegração das membranas celulares e liberação do conteúdo celular, sem ativação de caspase ou fragmentação do DNA (HARIHARAN *et al.*, 2010). Assim, a morte dos melanócitos ocorre através de necrose e não apoptose. Após a difusão de monobenzona para dentro dos melanossomos de células pigmentadas, ocorre sua conversão (através da tirosinase) em espécies tóxicas como quinonas, as quais reagem com macro moléculas essenciais, como proteínas e DNA, causando, assim, morte dos melanócitos (ALGHAMDI; KUMAR, 2011). Parece que a despigmentação gerada é irreversível, com perda de melanossomos e eventualmente de melanócitos.

Zhu e cols. (2013) mostraram que a monobenzona (40%), quando aplicada topicamente em camundongos, causa perda de melanócitos epidérmicos e acúmulo de células TCD8⁺ na região perilesionada das regiões despigmentadas encontradas nesse modelo. Além disso, análises histológicas mostraram considerável semelhança com a pele de pacientes com vitiligo (ZHU *et al.*, 2013)

Pesquisas mais sólidas necessitam de modelos *in vitro* e modelos animais com o intuito de investigar novas terapias, bem como vias da fisiopatologia da doença.

1.4 Plantas medicinais e vitiligo

A investigação da eficácia de produtos naturais existe, no entanto, a qualidade dos estudos e seu conteúdo são muito pobres. Além disso, os relatos citados possuem algumas falhas. Na maioria dos estudos, os produtos naturais são usados como adjuvantes da fototerapia UVA ou UVB. Existem poucos trabalhos controlados estimando a eficácia de produtos naturais no vitiligo, mas aqueles que têm sido publicados, geralmente mostram fracos resultados positivos com algumas reações adversas. O uso oral do *Ginkgo biloba* como monoterapia também é promissor. Sua eficácia aparente sem a necessidade de fototerapia é uma opção, visto que, conseqüentemente, não há surgimento dos seus efeitos adversos (SZCZURKO; BOON, 2008).

A maioria dos ensaios clínicos identificados não é controlada; e a maioria dos ensaios controlados possui qualidade metodológica pobre, sem

randomização, com falta de informações na frequência da dosagem, retirada de participantes e/ou análise estatística. Além disso, poucos ensaios são duplo cego (SZCZURKO; BOON, 2008). Conseqüentemente, necessita-se de avanços nessa área. Mesmo assim, alguns estudos com plantas medicinais merecem destaque.

A *Cassia occidentalis* mostrou ação na indução da diferenciação e migração de células da linhagem de melanoblastos de camundongos, sugerindo seu potencial para a repigmentação, visto que, no vitiligo, os melanócitos da epiderme se perdem, enquanto que células melanoblásticas dos folículos pilosos não são afetados (BABITHA *et al.*, 2011). Já *Piper nigrum* promove proliferação de melanócitos *in vitro* (LIN *et al.*, 2007).

Polypodium leucotomos, em estudo controle com 50 pacientes mostrou que sua combinação (250 mg, via oral, 2 x/dia) com UVB-NB (2x semana) causou aumento da repigmentação fracamente significativa no pescoço e mãos quando comparada com grupo placebo (MIDDELKAMP-HUP *et al.*, 2007; NESTOR *et al.*, 2014).

Em uma revisão de Zhang e cols. (2005) foi mostrado que algumas ervas chinesas são capazes de promover adesão e/ou migração de melanócitos, podendo ter um papel no tratamento do vitiligo; entre elas, pode-se citar: *Fructus psoraleae*, *Radix angelicae*, *Radix salviae*, *Fructus ligustri*, *Fructus tribuli*, *Semen cuscutae* e *Radix astragali* (ZHANG *et al.*, 2005).

Ali e cols. (2011) mostraram que o extrato das sementes da *Nigella sativa* e seu composto ativo timoquinona mimetizam a ação da acetilcolina na dispersão de melanina, levando ao escurecimento da pele via estimulação de receptores muscarínicos, quando observados em melanóforos isolados de lagartixas, sugerindo sua aplicação clínica em doenças de pele hipopigmentantes (ALI; MEITEL, 2011).

A maior quantidade de estudos diz respeito ao *Gingko biloba*. Parsad e cols. (2003) mostraram que, quando administrado três vezes ao dia, durante seis meses, foi capaz de parar a disseminação do vitiligo em 80% dos participantes do grupo ativo e promoveu repigmentação em 75% dos participantes (PARSAD *et al.*, 2003). No entanto, Szczurko e cols. (2011) não obtiveram resultados conclusivos, apesar de afirmarem que o *G. biloba* é capaz de ter um papel no gerenciamento do vitiligo (SZCZURKO *et al.*, 2011).

1.5 *Pyrostegia venusta*

A *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers pertence à família Bignoniaceae, ordem Lamiales, classe Magnoliophyta. É uma trepadeira lenhosa nativa difundida no Brasil, especialmente encontrada em todo campos, na costa, florestas e ao longo das estradas (LORENZI, 1995). Sua distribuição geográfica atinge o sul do Brasil, Paraguai, Bolívia e nordeste da Argentina (SANDWICH N.Y.; HUNT, 1974). Popularmente é conhecida como cipó-de-são-joão, flor-de-são-joão, cipó-bela-flor, cipó-vermelho, marquesa-de-belas, cipó-pé-de-lagartixa e cipó-pé-de-lagarto. Esta espécie é cultivada por conta de suas excelentes características ornamentais e de suas propriedades terapêuticas importantes (LORENZI, 1995).

Os principais componentes químicos relatados a partir de flores de *P. venusta* são: sitosterol, ácido hexadecanóico, ácido linoleico, ácido oleico, éster pentametildisilanil, acetofenona, ácido trans-3-hexenodioico e ácido 9-octadecenoico (Z)-metil (DUBEY, 1976; ROY *et al.*, 2012). Enquanto que as raízes possuem, principalmente, alantoína, esteróides, sitosterol-3-O-d-glicopiranosilsitosterol flavanona e hesperidina (FERREIRA, 2000). Estudos de Satyavathi e cols. (1984) e outros mais atuais têm revelado a presença de diferentes classes de flavonóides e fenóis nas folhas, independentemente do local de ocorrência da planta (SATYAVATHI, 1984).

Etnofarmacologicamente, flores e folhas desta planta são usadas em medicamentos populares para o tratamento de manchas brancas na pele e vitiligo. Uma infusão preparada a partir das cascas e raízes é amplamente utilizada no tratamento de icterícia (hiperbilirrubinemia e deposição de pigmentos biliares) em recém-nascidos e de infecções do útero e do trato genital feminino (FERREIRA, 2000).

Folhas e caules de *P. venusta* são utilizados na medicina popular como agente tônico ou antidiarreico, enquanto as suas flores são usadas no tratamento de manchas brancas no corpo. Além disso, é também usada no alívio da tosse e doenças comuns do sistema respiratório relacionadas com infecções, tais como a gripe e bronquite (FERREIRA, 2000; SCALON 2008; VELOSO *et al.*, 2010). Roy *et al.* (2011) demonstraram que os extratos de flores e raízes de *P. venusta* contêm quantidades significativas de fitoquímicos

com propriedades antioxidantes que podem agir como inibidores ou captadores de radicais livres (ROY *et al.*, 2011). Além disso, nenhum efeito genotóxico foi observado após tratamento com extratos em medula óssea de ratos usando o teste de aberração do micronúcleo e cromossomo (MAGALHÃES, 2010).

Analisada de uma forma geral, a *P. venusta* possui alguns efeitos interessantes que merecem maior atenção dos pesquisadores como: ações antioxidante, antimicrobiana (ROY *et al.*, 2012), estrogênica, anti-inflamatória, antinociceptiva e efeito na cicatrização (MOSTAFA, 2013). Portanto, essa planta pode ser explorada como matéria-prima potencial para o desenvolvimento de medicamentos.



Figura 6. Folhas e flores de *P. venusta*.

Fonte: www.biodiversityexplorer.org

2 JUSTIFICATIVA

- Tendo em vista a falta de conhecimento a respeito da etiopatogenia do vitiligo, bem como todas as desvantagens apresentadas pelas terapias atualmente disponíveis, ainda é de extrema importância a busca por novas ferramentas que tornem o controle da doença eficaz, seguro e conveniente ao paciente;
- Atualmente, a taxa de descoberta de novos protótipos de drogas de fontes naturais, baseada nos princípios etnofarmacológicos, pode ser significativamente maior do que aquelas de origem sintética. Além disso, o conceito de Farmacologia reversa vem ganhando espaço, isto é, pesquisas têm levado em consideração a informação etnofarmacológica de plantas para otimização de estudos posteriores;
- Popularmente, a *Pyrostegia venusta* é usada no tratamento de manchas brancas e vitiligo;
- A expansão mundial do mercado voltado para produtos derivados de plantas exige que as agências regulamentadoras sejam mais rígidas com estudos relacionados no que diz respeito à eficácia e segurança de fitoterápicos. Dessa forma, estudos científicos de qualidade são necessários para que a população tenha acesso, futuramente, a terapias alternativas de excelência.

3 HIPÓTESE

Acredita-se que o extrato hidroetanólico obtido das folhas de *P. venusta* possui atividade hiperpigmentante, quando analisado *in vitro* e efeitos diretamente relacionados com as hipóteses da patogênese do vitiligo (processos inflamatórios, imunes e oxidativos), em modelos animais, devido à presença de polifenóis. Se a hipótese se confirmar, o efeito etnofarmacológico dessa planta será evidenciado.

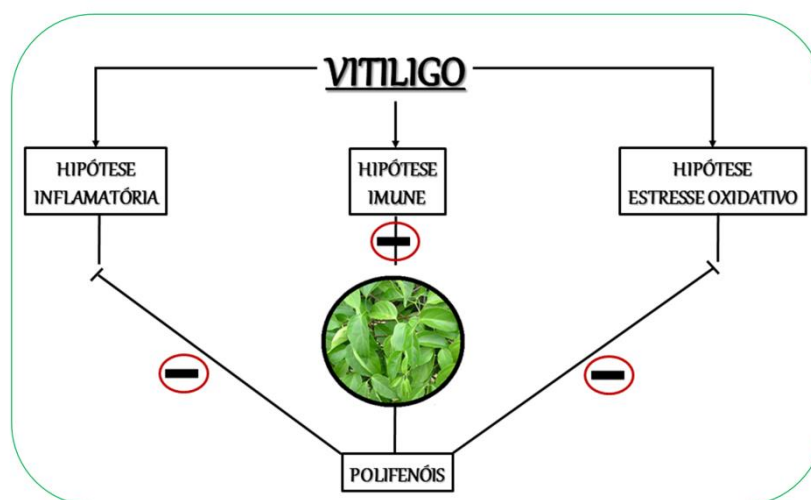
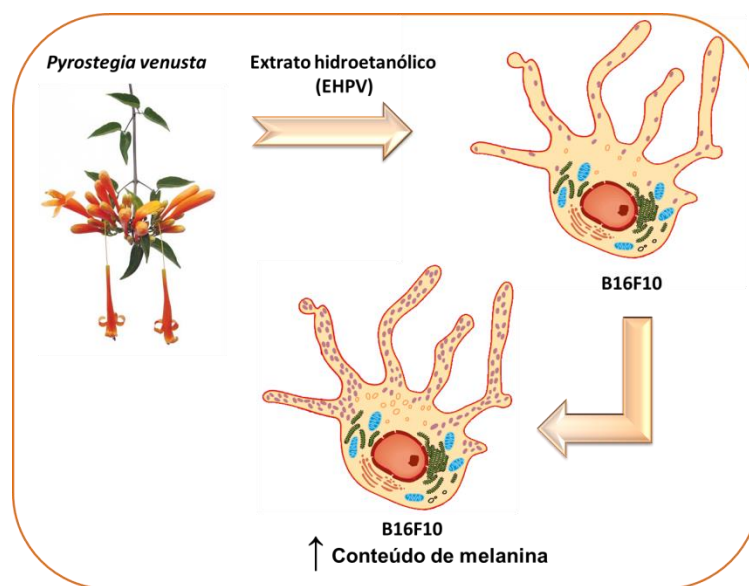


Figura 7. Hipótese do estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos pré-clínicos do extrato hidroetanólico das folhas da *Pyrostegia venusta* (EHPV) em modelos animais e modelos *in vitro*, como uma possível abordagem terapêutica no vitiligo.

4.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito hiperpigmentante do EHPV *in vitro*, através das avaliações de conteúdo de melanina e atividade de tirosinase;
- Verificar a ação anti-inflamatória de preparações farmacêuticas contendo o EHPV no modelo agudo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos, através da avaliação da formação de edema e atividade da enzima mieloperoxidase;
- Verificar a ação de preparações farmacêuticas contendo EHPV no modelo de edema de orelha induzido por aplicação repetida de óleo de cróton em camundongos, através da avaliação da formação de edema, migração leucocitária, níveis de citocinas e EROs;
- Verificar a ação de preparações farmacêuticas contendo EHPV no modelo de vitiligo induzido por monobenzona em camundongos, através da quantificação de melanina, pigmentação da derme, níveis de citocinas e EROs;
- Verificar efeitos adversos sistêmicos em camundongos, desenvolvidos a partir do tratamento tópico e por via oral do EHPV, através da avaliação do peso dos animais e órgãos linfoides no modelo de vitiligo induzido por monobenzona;
- Avaliar o possível dano no DNA causado pelo EHPV *in vitro*;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Drogas e reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: Óleo de cróton (OC), 4-(Benzyloxy)phenol (monobenzona), melanina sintética, tetrametilbenzidina (TMB), *p*-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glicopiranosídeo (NAG), hexadeciltrimetilamônio (HTAB), 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), tacrolimo (Sigma Chemical Co, EUA), Kit ELISA para citocinas (BD Biosciences, CA, USA). Para administração através de gavagem (via oral), a *P. venusta* foi solubilizada em água; para as demais formulações, o extrato foi incorporado diretamente em creme não-iônico, gel de natrosol ou pomada; o tacrolimo foi preparado em creme não-iônico e todos foram administrados por via tópica. O agente flogístico (óleo de cróton) foi diretamente solubilizado em acetona grau P.A. e administrado por via tópica. A monobenzona foi preparada em creme não-iônico.

5.2 Coleta e identificação botânica

Folhas da *P. venusta* foram coletadas na cidade de Colombo, Paraná, Brasil, em julho de 2008 (25°19'16" Sul; 49°09'31" Oeste). A espécie foi identificada pelo botânico Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico de Curitiba (MBM). A exsicata encontra-se depositada no MBM (Jardim Botânico de Curitiba) sob o número 338804-02.

5.3 Obtenção do extrato bruto

O processo de extração foi feito a partir das folhas secas e pulverizadas (100 g) com etanol:água (70:30, v/v) por turbólise (Ultra Turrax Biotrona BA 80, Kinematica AG) em temperatura ambiente por duas horas. O extrato hidroetanólico de *P. venusta* (EHPV) foi filtrado com papel filtro (Adventec N° 1) e evaporado a 50 °C sob pressão reduzida. Após, foi armazenado a - 20 °C. Antes de qualquer ensaio farmacológico, o extrato foi solubilizado (água, creme não-iônico, pomada ou gel de natrosol).

5.4 Cultivo celular

A linhagem B16F10 (melanócito de melanoma de camundongo) foi cultivada em meio Dulbecco Eagle's Modificado (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (10.000U e 100 µg/ml, respectivamente), em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C.

5.5 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular, após o tratamento com diferentes concentrações do extrato, foi determinada através de dois ensaios: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e vermelho neutro (VN).

5.5.1 Vermelho neutro

O ensaio de viabilidade celular através da incorporação do VN é baseado na habilidade de lisossomos de células viáveis em absorver o corante vermelho neutro. Melanócitos da linhagem B16F10 foram plaqueados na densidade de 7×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h, o meio foi removido, as células lavadas 2 vezes com PBS e as diversas concentrações preparadas em meio DMEM (1% SFB) foram adicionadas. Após 24 h, o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e a solução de VN (50 mg/mL) foi adicionada em cada poço (200 µL), de acordo com Borenfreund e Puener (1985), com algumas modificações (BORENFREUND, 1985). Após 4 h, o meio foi removido e 100 µL do fixador formaldeído a 1% foi adicionado em cada poço. Após a remoção do fixador, 200 µL de uma solução composta por 10 mL de ácido acético glacial, 500 mL de etanol 99 e 490 mL de água destilada foi adicionada em cada poço, seguido de agitação. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm usando o leitor de microplaca (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.5.2 MTT

O ensaio de viabilidade celular através do método do MTT foi realizado de acordo com Tada e cols. (1986), com algumas modificações (TADA *et al.*, 1986). O fundamento é que, quando a célula está viável, a atividade da desidrogenase mitocondrial faz com que seja formado um complexo com o MTT (formazan), possibilitando a leitura através da análise colorimétrica. De forma semelhante ao VN, 7×10^3 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h, o meio foi removido, lavado 2 vezes com PBS e as diversas concentrações preparadas em meio DMEM (1% SFB) foram adicionadas. Após 24 e 96 h (ensaios distintos), o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada em cada poço (200 μ L). Após 4 h, a solução de MTT foi removida e 200 μ L de etanol 70° foi adicionado em cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm em um leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.6 Quantificação do conteúdo de melanina

A influência do extrato na produção de melanina na linhagem de melanócitos foi avaliada usando o método modificado de Tsuboi e cols. (1998) (TSUBOI *et al.*, 1998). Células foram adicionadas em placas de 24 poços na densidade de 4×10^4 células/poço. Após 24 h, o meio DMEM a 10% foi removido e as células foram lavadas com PBS. As concentrações do extrato (0,1; 0,3, 1 e 3 μ g/mL) e ácido kójico a 1 mM (droga de referência) foram adicionadas nos poços e incubados por 4 dias a 37 °C em 5% CO₂, em atmosfera umidificada. Após esse tempo, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e 500 μ L de uma solução hidróxido de sódio (NaOH) 1 N com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionada e mantida por 1 h a 80 °C. O conteúdo relativo de melanina foi determinado através da mensuração da absorbância a 405 nm no leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.7 Atividade enzimática da tirosinase

A atividade da tirosinase, tendo a L-tirosina como substrato, foi determinada espectrofotometricamente pelo método descrito por Hyun e cols. (2008), com pequenas modificações (HYUN *et al.*, 2008). 10 μ L de cada concentração dos

extratos e 20 μL de tirosinase de cogumelo (500 U/mL) em tampão fosfato 50 mM (pH 6,5) foram adicionados a 170 μL de uma mistura contendo a proporção 10:10:9, de uma solução de L-tirosina 1 mM, tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e água destilada em uma microplaca de 96 poços. Após a incubação da mistura a 37 °C por 30 min, a absorbância foi medida em 490 nm utilizando um leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.8 Genotoxicidade *in vitro*

As células da linhagem B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 1×10^5 células por poço. Após 24 h, o meio foi retirado, lavado duas vezes com PBS e os tratamentos com as concentrações do EHPV foram adicionadas, bem como o peróxido de hidrogênio (100 μM), usado como controle positivo de dano do DNA celular, todos preparados com meio a 1%. Após 2 h, o meio com os tratamentos foi removido e as células foram desaderidas com tripsina, por 3 min a 37 °C. As soluções foram neutralizadas com meio a 10% SFB, centrifugadas por 6 min a 2000 rpm e, logo após, o sobrenadante foi descartado. As células tratadas com o EHPV, peróxido de hidrogênio e as tratadas somente com meio a 1%, foram suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e, então, colocadas em lâminas de vidro para microscopia, previamente recobertas com uma camada de agarose. Em seguida, foram submetidas a uma corrida de eletroforese e coloração, de acordo com (SPEIT; HARTMANN, 1999). O princípio dessa técnica baseia-se no fato de que o DNA das células que não tiverem dano migrarão em conjunto, formando uma espécie de círculo. Caso ocorram danos no DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos de tamanho menor tendem a migrar mais rapidamente que os maiores. Quando ocorre um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando, então, a figura típica de um cometa (KIM *et al.*, 2002). A avaliação dos danos foi feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração, classificados de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo).

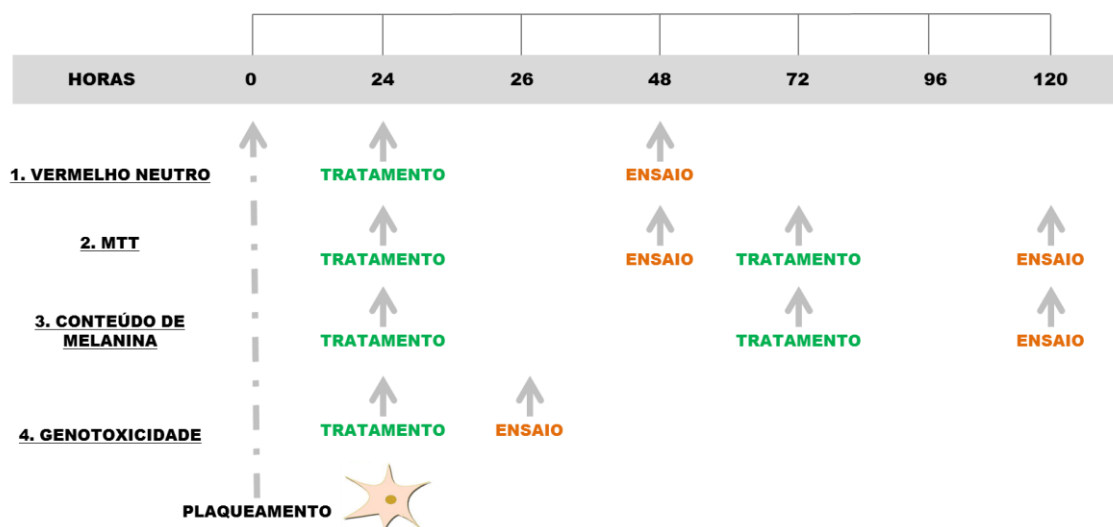


Figura 8: Delineamento experimental dos ensaios *in vitro*.

5.9 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Animais da linhagem C57/BL6 (machos e fêmeas) foram provenientes da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todos os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração comercial. Foram mantidos na sala de experimento para adaptação, por pelo menos quarenta e oito horas antes da realização dos testes. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEUA, 2012) e o projeto foi aprovado sob o número 738. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “The guide for the care and use of experimental animals (Canadian Council on Animal Care)”.

5.10 Modelo de edema de orelha

O processo inflamatório apresenta os denominados sinais cardinais: dor, edema, rubor, calor e, em alguns casos, perda da função. O modelo de edema

de orelha é utilizado para a verificação da atividade de substâncias frente a um processo inflamatório e a sua capacidade de redução do edema. O edema é expresso como o aumento da espessura (μm) da orelha dos camundongos. A espessura foi medida próxima à extremidade medial da orelha e registrada com o auxílio de um micrômetro digital (Electronic Outside Micrometer DIGIMESS 0,25 mm - 0,001 mm). O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinados tempos da indução do processo inflamatório. O agente flogístico foi aplicado topicamente na orelha direita de cada camundongo (linhagem Swiss).

5.10.1 Avaliação do edema agudo induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton (OC)

Um dos principais componentes do OC é o TPA, um éster de forbol utilizado como agente flogístico. Ele é capaz de induzir uma resposta inflamatória bastante intensa, provocando aumento da permeabilidade vascular, ativação da PKC, liberação dos metabólitos do ácido araquidônico, indução de enzimas, entre outros eventos (GARG *et al.*, 2008). O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica do OC (0,4 mg/orelha em 20 μL de acetona) na orelha de camundongos. O EHPV, em diversas formulações e doses, bem como o tacrolimo a 0,1% (droga de referência) foram administrados 60 minutos antes da aplicação do OC, bem como 30 minutos após nos grupos experimentais, com exceção do tratamento por via oral, no qual a administração por gavagem foi realizada logo após a indução com o OC. A espessura da orelha foi medida antes (basal) e 6 horas após a aplicação do agente flogístico. Amostras dos tecidos das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas 24 horas após a aplicação do OC e submetidas à análise da atividade da enzima mieloperoxidase.

5.10.2 Edema de orelha crônico induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

O modelo de inflamação crônica com a aplicação de óleo de cróton permite avaliar a ação anti-inflamatória da substância-teste frente a um processo

inflamatório já estabelecido. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20 μ L de acetona) em dias alternados, durante 9 dias. O EHPV (em dose determinada após o teste de edema agudo com OC), assim como o tacrolimo (0,1%), começaram a ser administrados a partir do quinto dia de experimento, sendo aplicados por via oral ou tópica (dependendo da formulação) durante 5 dias consecutivos (2 vezes ao dia) e o edema avaliado diariamente (STANLEY *et al.*, 1991). No 9º dia do experimento os animais foram eutanasiados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados, pesados e armazenados a -80 °C. Foram utilizados posteriormente para avaliações da atividade das enzimas MPO e NAG, determinação de níveis de citocinas e EROs, bem como na análise histológica.

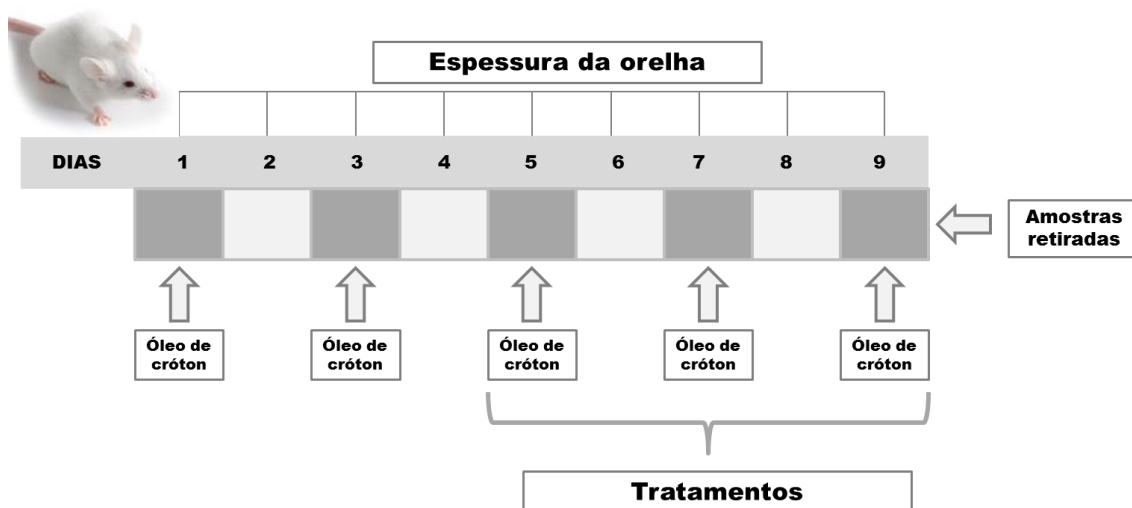


Figura 9: Delineamento experimental do modelo de inflamação induzido por múltiplas aplicações de OC.

5.11 Avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é encontrada em grandes quantidades em vesículas de neutrófilos ativados; assim, é usada como marcador bioquímico do recrutamento dessas células para o local inflamado. A metodologia empregada para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi a de Bradley e cols. (1982) modificada por Young e cols. (1989). As amostras de tecido (círculos de 6 mm do tecido das orelhas de camundongos) obtidas nos modelos de edema agudo e crônico, foram adicionadas a 0,75 mL de tampão

fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por cerca de 45 segundos em gelo. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 11200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde, posteriormente, foram adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µL de PBS 0,22M (pH 5,4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µL de TMB 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8% promove o início da reação. A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos (37°C), e a reação interrompida após adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) no comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em densidade óptica/amostra (mDO/amostra).

5.12 Avaliação da atividade enzimática da n-acetil-β-d glucosaminidase (NAG)

A avaliação da atividade da NAG indica a presença de leucócitos mononucleares, os quais são de grande importância em processos inflamatórios crônicos. Portanto, esse ensaio foi realizado a partir de amostras de orelhas de camundongos submetidas à aplicação múltipla do óleo de cróton no modelo de inflamação após múltiplas aplicações de OC (SÁNCHEZ; MORENO, 1999). As amostras (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por cerca de 45 s em gelo. O homogenato foi decantado em microtubos e foram adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 25 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionado 100 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação é iniciada pela adição de 25 µL de p-nitrofenil-2-acetamida-β-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em água milliQ. Logo após a placa foi incubada a 37 °C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 µL de tampão glicina 200 nM (pH 10,4)

em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente utilizando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura foi realizada na absorvância de 405 nm e os resultados expressos como mDO/tecido.

5.13 Análise histológica

As amostras do tecido de orelhas coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo, em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico, e a infiltração de células foi avaliada em áreas representativas com aumento de 200x. A quantificação das células presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos. A contagem destas células por campo foi feita utilizando o software ImageJ 1.46R.

5.14 Modelo animal de vitiligo induzido pela aplicação repetida de monobenzona

O efeito da *P. venusta* foi testado em modelo animal de vitiligo, conforme (ZHU *et al.*, 2013). A dose foi determinada após a obtenção dos resultados anteriores. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “The guide for the care and use of experimental animals (Canadian Council on Animal Care)”. Os animais C57BL/6 de 4 semanas de idade foram mantidos no biotério e sala de experimentação com alimentação e água *ad libitum*. Animais C57BL/6 foram divididos, randomicamente, em 6 grupos, de 4-7 camundongos por grupo. Os dorsos dos animais foram tricotomizados. Uma preparação contendo 40% de

monobenzona em creme não-iônico (50 µL) foi diariamente aplicada no dorso de todos animais, com exceção dos animais do grupo naíve. A aplicação foi realizada sempre no mesmo local (dorso na região próxima à cauda), numa área de 2 x 2 cm, massageada até a completa penetração com o auxílio de espátula. Em outra região dos animais, com área similar (dorso na região próxima ao pescoço), creme não-iônico incorporado com 10% de *P. venusta* e creme não-iônico incorporado com 0,1% de tacrolimo (ambos aplicados e massageados até a completa penetração), ou *P. venusta* 300 mg/kg (via oral, através de gavagem) foram administrados. Todos os tratamentos foram realizados por 65 dias, com exceção do agente indutor de vitiligo, a monobenzona, a qual foi administrada até o dia 50. Semanalmente fotos foram tiradas para avaliação posterior do desenvolvimento da despigmentação nos mesmos. Após 65 dias, os animais foram eutanasiados e círculos de 6 mm das orelhas foram coletados. Toda a pele do dorso e cauda foi removida. Amostras foram estocadas em -80°C para ensaios posteriores. Amostras da pele do dorso foram coletadas e imersas em solução de formalina a 10% para avaliações histológicas. Amostras foram utilizadas, também, para avaliar grau de despigmentação, níveis de melanina epidermal, níveis de citocinas (IL-6, IL-1 β and TNF- α) e análises histológicas (coloração de hematoxilina-eosina e Fontana-Masson).

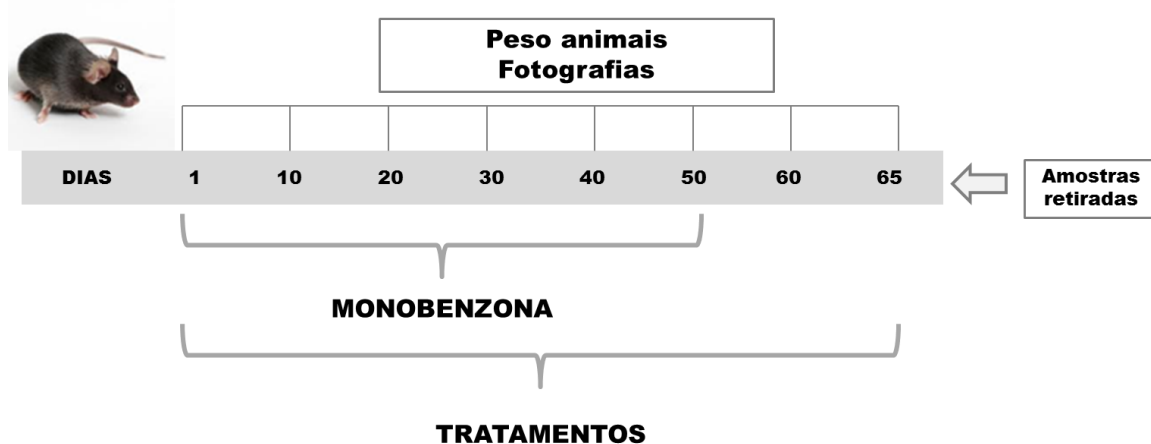


Figura 10: Delineamento experimental do modelo de vitiligo induzido por múltiplas aplicações de monobenzona.

5.15 Determinação do escore e disseminação de vitiligo

A extensão da despigmentação para o tratamento dos grupos foi quantificada de maneira “cega” por avaliadores. Foram examinados os locais de aplicação e a extensão da despigmentação (estimada como porcentagem de locais anatômicos, nos quais surgiu despigmentação). O escore de despigmentação foi definido como a soma dos escores de cada animal/avaliador.

5.16 Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tecidos

A determinação de EROs foi baseada nos métodos de Hempel e cols. (1999), com algumas modificações (HEMPEL *et al.*, 1999). Este método determina níveis de EROs intracelulares, diretamente a geração de oxigênio na forma de radicais livres usando o composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato. Esse é capaz de se difundir para o interior das células, onde é hidrolisado, por esterases intracelulares, a um produto fluorescente (DCFH). Esse análogo fluoresceína não fluorescente é oxidado pelos oxidantes intracelulares a 2',7'-diclorofluoresceína altamente fluorescente. A medida basal da espessura das orelhas foi medida, seguida pela aplicação de TPA (2,5 µg / 20 µL acetona). A produção de EROs na pele de camundongos foi determinada após 6 horas da indução com TPA, em orelhas tratadas com diversos tratamentos e usado a vitamina E (0,3 mg/orelha) como controle positivo. As amostras teciduais (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS, pH 7,2, por 45 segundos a 0 °C. Os homogenatos foram incubados com DCFH-DA (concentração final de 2 mM) durante 40 minutos no escuro (37 °C). Em seguida, a conversão de DCFH-DA ao produto DCFH foi medida usando leitor de microplacas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) com excitação em 485 nm e emissão em 530 nm. Os resultados foram expressos em unidade de fluorescência.

5.17 Determinação dos níveis de citocinas

Para avaliar o perfil de citocinas liberadas no processo inflamatório induzido por múltiplas aplicações de OC e pelo modelo de vitiligo induzido por

monobenzona, as amostras teciduais (6 mm) foram homogeneizadas em tampão específico (PBS, 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzametônio, 10 mM de EDTA, 2 µg/mL de aprotinina, 0,5% de BSA e 0,4 M de NaCl) na proporção de 20% peso/volume e o homogenato centrifugado a 3000 g à 4 °C por 10 min. No sobrenadante, a concentração de proteínas de cada amostra foi verificada através do método de Bradford. A determinação dos níveis de citocinas foi realizada através de kit de ensaio de imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (Ready-Set-Go®, eBioscience). Os anticorpos de captura respectivos para IL-6, TNF- α e IL-1 β foram diluídos para a concentração de uso de acordo com o fabricante do Kit, adicionados 100 µL/poço em placa de 96 poços e incubados *overnight*. Após incubação, os poços foram lavados (o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados três vezes com 400 µL/poço de tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween) e a placa esgotada sobre papel toalha, adicionado 300 µL de tampão de bloqueio (PBS, 1% BSA, 5% Sacarose, 0,05 mM NaNO₃) e incubado por 1 h. A placa foi lavada (como descrito anteriormente) e as amostras (100 µL) foram incubadas. Após 2 h, a placa foi lavada e adicionada 100 µL de streptavidina diluída (1:200) em PBS + 1% de BSA em cada poço e incubado por 20 min no escuro. A placa foi lavada, incubada por 20 min no escuro com 100 µL/poço de solução substrato (TMB + H₂O₂). A reação foi encerrada com a adição de 50 µL da solução de parada (H₂SO₄ 2 N). A densidade óptica foi determinada a 450 nm e a 550 nm, sendo o resultado expresso pela diferença entre a segunda e a primeira leitura.

5.18 Determinação dos níveis epidermais de melanina

Amostras do dorso e cauda foram submetidas à avaliação dos níveis de melanina. Previamente, a epiderme foi separada da derme com solução de EDTA 20 mM, a 37 °C, *overnight*. Às amostras foi adicionado tampão RIPA (tampão tris 1M, cloreto de sódio 4M, EDTA 20 mM, triton 1%, dodecil sulfato de sódio 0,1%, deoxicolato de sódio 0,5% e água MilliQ), homogeneizados e centrifugados a 12000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram retirados e 20% de DMSO em uma solução de NaOH 1N foi adicionada ao pellet e mantida em ebulição até sua dissolução total. Os níveis de melanina

foram determinados colorimetricamente usando leitor de microplacas, na absorvância de 470 nm. Uma curva de melanina sintética foi usada como referência. As concentrações foram normalizadas com o peso das epidermes correspondentes. Os resultados foram expressos como concentração de melanina ($\mu\text{g/mL}$)/mg de epiderme.

5.19 Determinação da despigmentação da derme

Imediatamente após a remoção da epiderme, fotos das dermes foram tiradas (Câmera Canon, modelo T3i, lente EF-S, 18-55 mm). Áreas pré-determinadas foram analisadas para cada animal, transformadas em tons de cinza (escala de 0-255) e histogramas foram gerados (Photoshop software, version 9). A média da escala por grupo foi plotada como gráfico. Os resultados foram expressos como despigmentação da derme.

5.20 Coloração de Fontana-Masson

Secções histológicas da pele do dorso foram desparafinizadas e hidratadas em banhos sucessivos de xileno e etanol e corados com Fontana-Masson. As amostras foram embebidas em solução de nitrato de prata por 1 h a 56 °C e lavadas com água destilada. Após, os cortes foram submetidos à solução de cloreto de ouro por 10 minutos e lavados em água destilada. Os cortes foram reduzidos em solução de tiosulfato de sódio 5% por 5 minutos e lavado com água destilada. Por fim, os cortes foram mergulhados em solução de *fast red* por 5 minutos, enxaguados com água destilada e então desidratados. Os cortes foram montados com Bálsamo do Canadá e cobertos com lamínula. Vários campos foram *scaneados* e a marcação específica para melanina avaliada.

5.21 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e de duas

vias, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni, dependendo do ensaio realizado. Para dados não-paramétricos, foi utilizado qui-quadrado. Para o cálculo da concentração capaz de diminuir a viabilidade celular em 50% (CL₅₀), regressões não-lineares dos grupos foram avaliadas por ANOVA de duas vias, seguida por análise da concentração x log da resposta. O nível de significância aceito para os testes é de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.0, São Diego, Califórnia, EUA.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliações *in vitro*

6.1.1 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações do extrato HE da *P. venusta* foi realizada através dos métodos do VN e MTT, com o intuito de avaliar a ação do extrato sobre as membranas celulares e atividade de desidrogenases, respectivamente.

No VN (Fig 11A), as concentrações de 100, 300 e 1000 µg/mL foram capazes de reduzir a viabilidade celular, na ordem, em $41,7 \pm 4\%$, $43,6 \pm 2,8\%$ e $40,7 \pm 5\%$. As demais concentrações não causaram alteração alguma na viabilidade celular. Já no ensaio do MTT (Fig 11B), além das concentrações anteriores, a concentração de 30 µg/mL também reduziu significativamente a viabilidade celular em $24,7 \pm 1,2\%$. De forma similar ao método do VN, a concentração de 100 µg/mL diminuiu $42,6 \pm 4,4\%$; enquanto que as concentrações de 300 e 1000 µg/mL diminuíram bastante as porcentagens de viabilidade, em $69,2 \pm 4,2\%$ e $79,1 \pm 3,7\%$. Dessa forma, a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (CL_{50}) foi calculada a partir dos resultados obtidos pelo método do MTT (Fig 11C). Após a conversão das concentrações em logaritmo, o gráfico foi gerado e o valor de CL_{50} encontrado foi de 108,8 µg/mL (70,72 – 167,5 µg/mL), ou seja, essa concentração é capaz de reduzir a viabilidade das células da linhagem B16F10 em 50%.

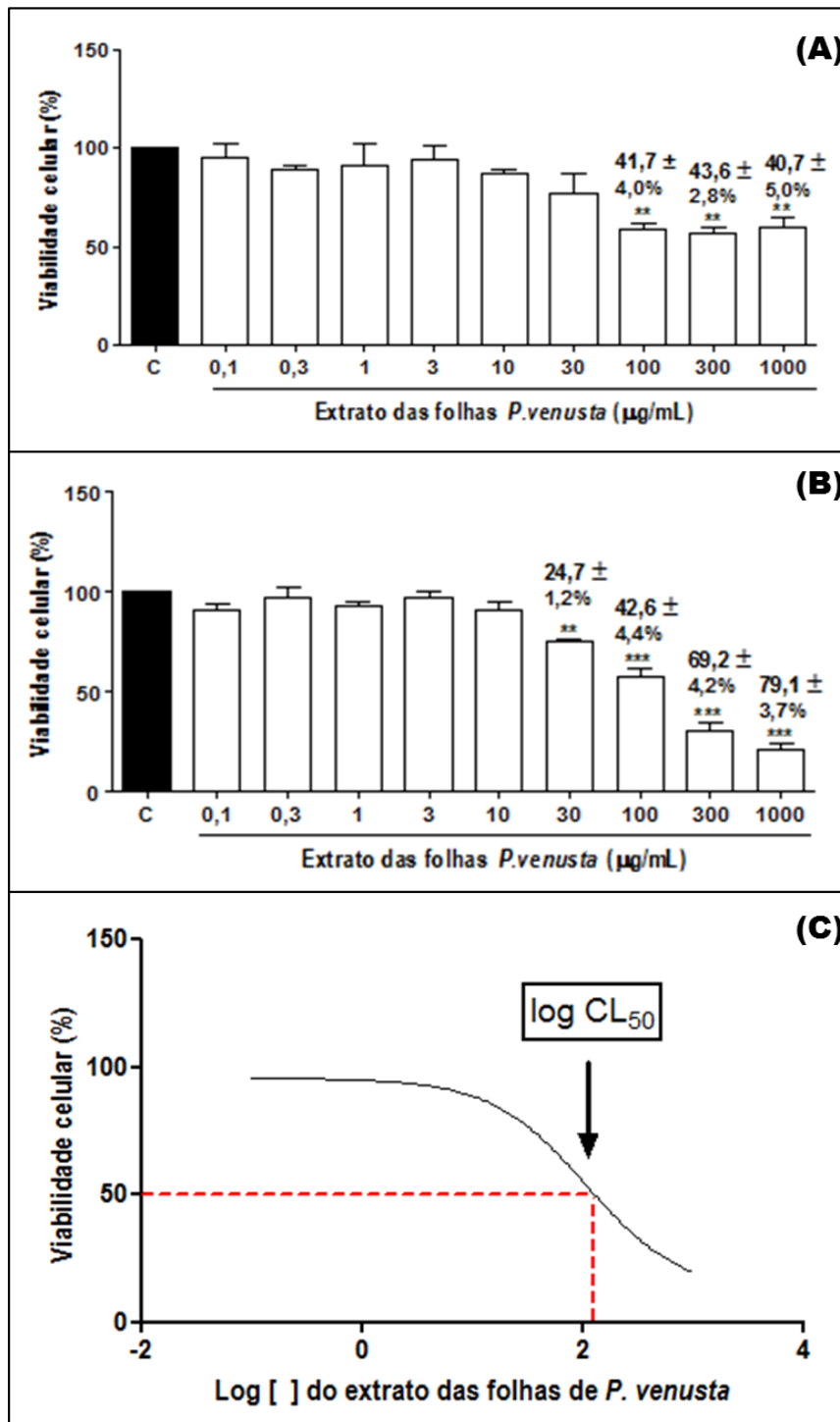


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular de B16F10 após exposição a diferentes concentrações do extrato HE de *P. venusta* por 24 h. As células da linhagem B16F10 foram expostas a diferentes concentrações do extrato durante 24 h. Após, os métodos do Vermelho neutro (A) e do MTT (B) foram realizados, bem como a determinação da CL₅₀ (C). C (controle): células em contato com o meio de cultivo. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de três experimentos separados. **P<0,01; ***P<0,001 são estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Como o ensaio para avaliação do conteúdo de melanina é realizado no período de 96 h após o plaqueamento, foi importante analisar de que forma as células se comportariam frente ao EHPV nesse mesmo tempo (Fig 12). Somente a partir da concentração de 10 µg/mL é que surgiu alteração na viabilidade celular, analisada através do método do MTT (Fig 12A), com redução de $62 \pm 8\%$ ($P < 0,001$); já para as concentrações de 30 e 100, os valores obtidos foram de $84,4 \pm 0,8\%$ ($P < 0,001$) e $85,2 \pm 1,6\%$ ($P < 0,001$), respectivamente.

De forma similar, a análise da CL_{50} foi verificada (Fig 12B) alcançando o valor de 7,701 µg/mL (4,196 – 14,13 µg/mL). Assim, como esperado, a concentração capaz de alterar a viabilidade das células B16F10 é menor do que a encontrada no tempo de 24 h. Para que não houvesse qualquer mascaramento de efeitos devido à diminuição de células viáveis, as concentrações utilizadas nos ensaios posteriores foram aquelas abaixo de 10 µg/mL.

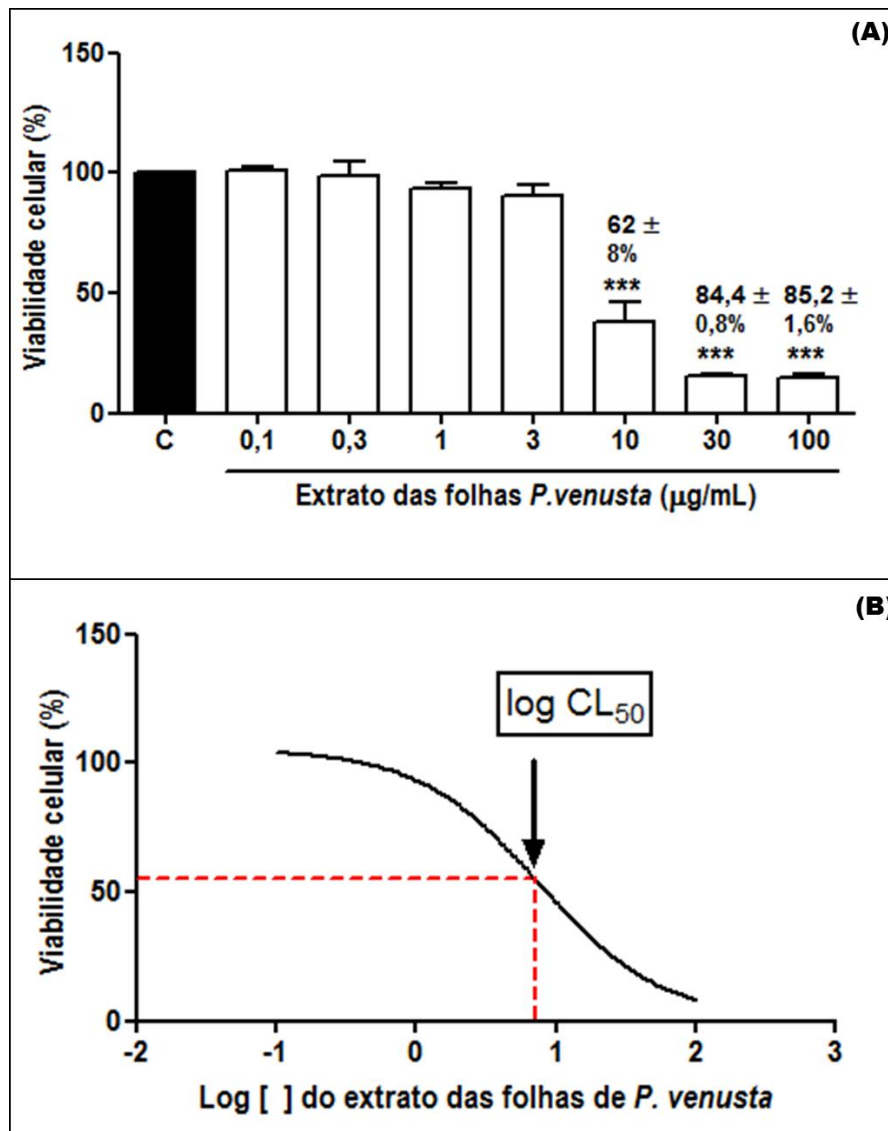


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular de B16F10 após exposição a diferentes concentrações do extrato HE de *P. venusta* por 96 h. As células da linhagem B16F10 foram expostas a diferentes concentrações do extrato durante 96 h. Após, os métodos do MTT (A) a CL₅₀ (B) foram determinados. C (controle): células em contato com o meio de cultivo. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. de três experimentos separados. *** $P < 0,001$ são estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.1.2 Avaliação do efeito do EHPV no conteúdo de melanina

A atividade melanogênica nas células B16F10 é diretamente relacionada à quantidade da produção de melanina, a qual é estimada através da quantidade de melanina retida nas células (melanina intracelular). Esse ensaio é bastante importante, visto que a produção de melanina está inversamente relacionada com as manchas encontradas em pacientes com vitiligo. Se um composto é capaz de aumentar a produção de melanina em uma linhagem celular de melanócitos, poderá, possivelmente, aumentar a produção da melanina em melanócitos remanescentes funcionais. O EHPV aumentou a quantidade de melanina (Fig 13) em resposta a várias concentrações do extrato HE das folhas (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Essas concentrações foram determinadas após os resultados obtidos anteriormente. Como representado, o EHPV promoveu aumento da quantidade de melanina com efeito máximo de $33,3 \pm 3,0\%$ (3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O ácido kójico foi usado como droga de referência. Este composto é usado como agente despigmentante em várias doses. Para esse experimento, foi usado o ácido kójico na concentração de 1 mM, e o mesmo causou redução da produção de melanina em $9,6 \pm 2,2\%$.

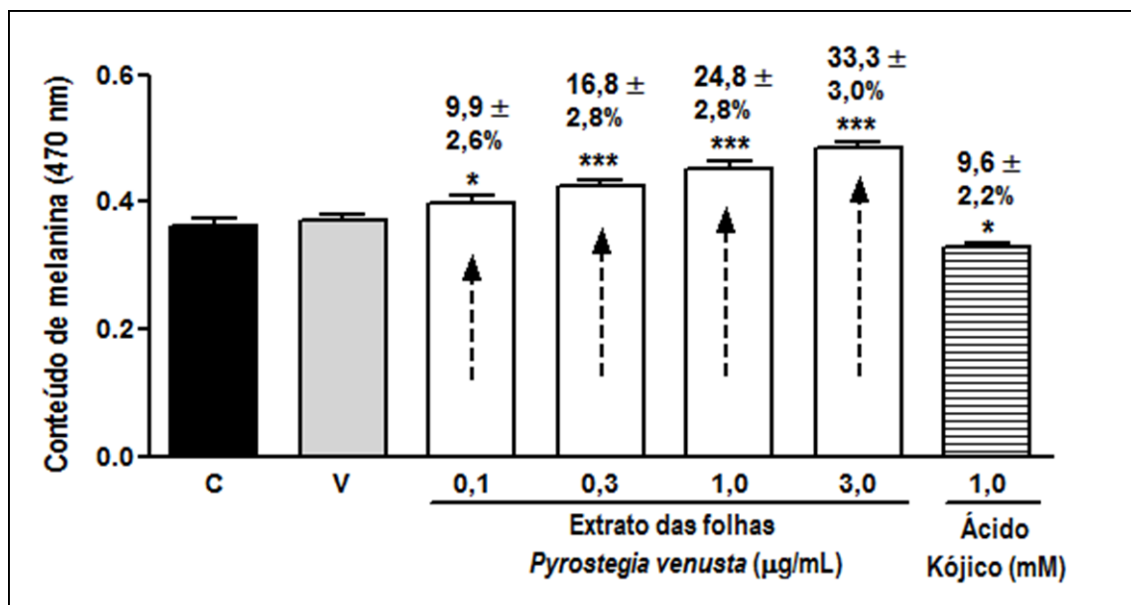


Figura 13. Efeitos dos extratos HE das folhas de *P. venusta* no conteúdo de melanina na linhagem B16F10 de melanoma de camundongos. A quantificação do conteúdo de melanina foi feita 96 h após a incubação com diferentes concentrações do extrato das folhas. O ácido kójico (1 mM) foi usado como droga de referência. C: células em contato com o meio de cultivo. Veículo (V): 0,02% etanol. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. de três experimentos separados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ são estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle.

6.1.3. Avaliação da ação do EHPV na atividade da tirosinase *in vitro*

Uma vez que houve alteração da quantidade de melanina intracelular e que a tirosinase é a enzima passo-limitante para a biossíntese de melanina, os efeitos da *P. venusta* na atividade da tirosinase foram investigados. As concentrações do extrato que alteraram o conteúdo de melanina não mostraram afetar significativamente a atividade da enzima em todas as concentrações testadas (Fig 14). O ácido kójico é um agente despigmentante bastante conhecido por reduzir a atividade da tirosinase e foi usado, novamente, como droga de referência. Nesse experimento foi capaz de diminuir a atividade em $41,7 \pm 1\%$.

É importante ressaltar que, com o intuito de excluir a possibilidade de interferência da própria coloração do extrato, todas as concentrações utilizadas nos experimentos *in vitro* foram expostas a todos os comprimentos de onda usados nos experimentos e nenhuma alteração foi observada quando comparados ao grupo controle (PBS). Esse procedimento foi feito para os comprimentos de onda usados nos ensaios de viabilidade celular, conteúdo de melanina e atividade da tirosinase (dados não-mostrados).

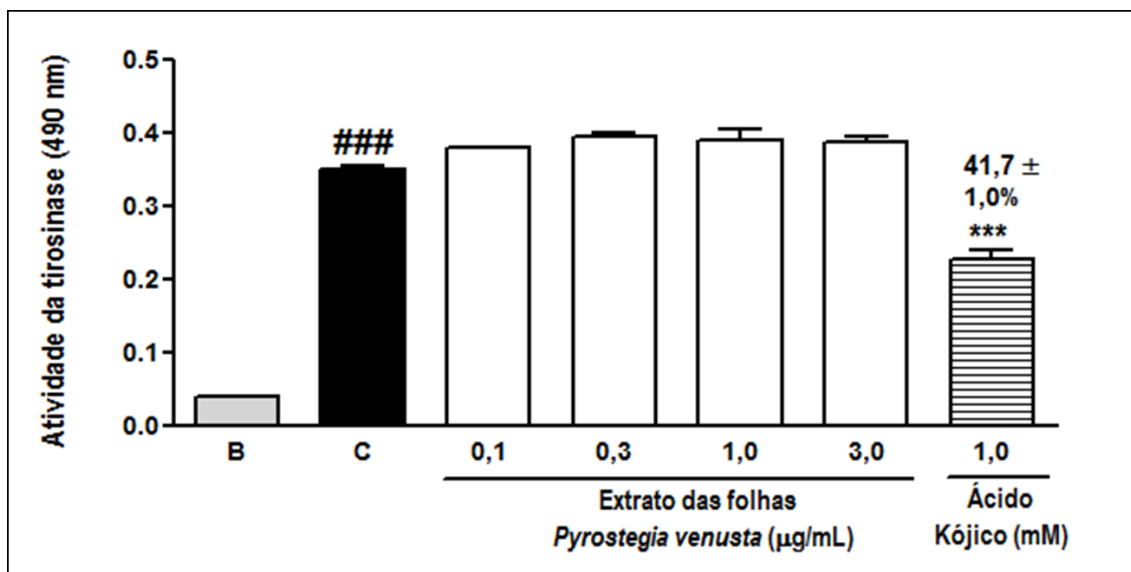


Figura 14. Efeito do extrato HE das folhas de *P. venusta* na atividade da enzima tirosinase. A inibição da atividade da enzima pelos extratos das folhas, em diferentes concentrações, foi examinada na presença de L-tirosina como substrato. Cada valor é dado como média \pm EPM de experimentos em triplicata. Branco (B): somente tirosina (em PBS); Controle (C): solução de tirosina + tirosinase (em PBS). O ácido kójico foi usado como droga de referência. ### $P < 0,001$ (comparado ao grupo B); *** $P < 0,001$ (estatisticamente diferente do grupo C).

6.1.4. Avaliação do possível dano no DNA causado pelo EHPV *in vitro*

Do ponto de vista científico, muitas plantas possuem substâncias potencialmente agressivas. Portanto, é de suma importância avaliar alguns possíveis riscos toxicológicos. Lesões no DNA podem ser observadas através do teste cometa, entre elas quebra de fita (responsável pela formação de aberrações cromossômicas) ou modificações nas bases do DNA. Conforme mostrado na Fig 15A, nenhuma concentração testada da *P. venusta* foi capaz de causar alteração no teste cometa, quando comparados ao grupo controle de dano no DNA (peróxido de hidrogênio). As fotos representativas (Fig 15B) demonstram que somente o peróxido de hidrogênio é capaz de formar uma cauda, representando a formação de fragmentos de DNA. Assim, podemos afirmar que, nas concentrações testadas, o extrato HE das folhas da *P. venusta* não foi capaz de causar lesões gênicas.

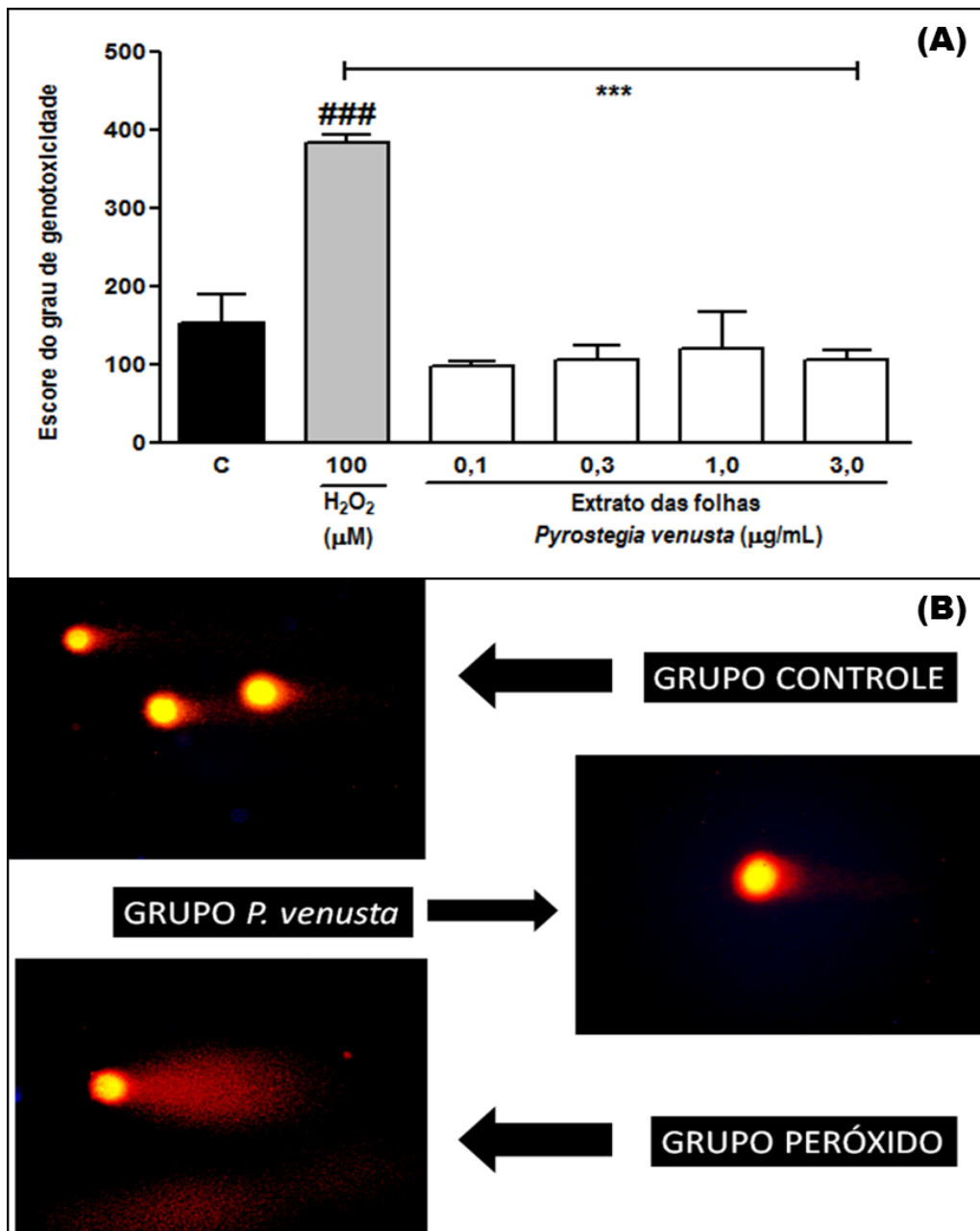


Figura 15. Avaliação do grau de genotoxicidade *in vitro* através do ensaio cometa. O extrato HE das folhas de *P. venusta* foi testado nas células da linhagem B16F10, usando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como controle positivo de dano no DNA na concentração de 100 μM . A) Média do escore dos tratamentos. B) Fotos representativas dos grupos testados. Todos os tratamentos foram realizados em meio com 1% de soro fetal bovino (SFB). C = células B16F10 apenas em meio com 1% de SFB. ### $P < 0,001$ (comparado com grupo C); *** $P < 0,001$ (comparado com o controle positivo de dano do DNA – H_2O_2). Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2 Avaliações *in vivo*

6.2.1. Verificação dos efeitos de preparações farmacêuticas contendo EHPV em parâmetros inflamatórios induzidos no modelo agudo de edema de orelha em camundongos

Após verificar as ações do extrato HE das folhas de *P. venusta* em melanócitos da linhagem B16F10, a segunda etapa do trabalho teve como objetivos determinar de que forma o extrato atuaria em animais, mais especificamente em alguns parâmetros que podem ser direta ou indiretamente relacionados com o vitiligo. Para isso, foi importante fazer triagem para avaliar a ação anti-inflamatória da *P. venusta* em animais Swiss, através do modelo agudo de inflamação induzido pelo óleo de cróton.

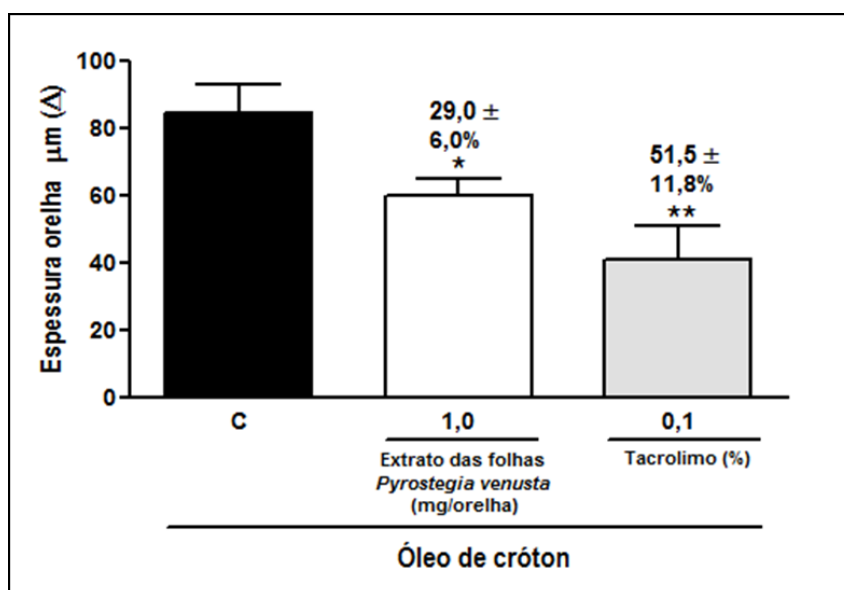


Figura 16. Avaliação da ação do extrato HE da *P. venusta* na espessura da orelha de animais através da aplicação de óleo de cróton. O efeito da *P. venusta* no modelo agudo de inflamação induzido pelo óleo de cróton (0,4 mg/orelha) foi avaliado 6 h após a indução da inflamação pelo agente flogístico. O extrato foi solubilizado em 20 µL de acetona e aplicado na orelha do camundongo. O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. As barras verticais representam a média ± E.P.M. Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo. Foram utilizados 5 animais por grupo. *P<0,05 e **P<0,01, quando comparado com o grupo controle (óleo de cróton).

Conforme a Fig 16, o extrato HE das folhas (1,0 mg/orelha) foi capaz de reduzir a espessura da orelha dos animais em $29,0 \pm 6\%$. O tacrolimo é uma droga imunossupressora usada topicamente do tratamento de pacientes com vitiligo. Possui, dentre outras ações, atividade anti-inflamatória de potência média. Foi utilizada como droga de referência (0,1%) e causou redução de $51,5 \pm 11,8\%$.

Visto que o extrato HE das folhas da *P. venusta* exerce ação no modelo agudo de inflamação, ele foi testado em quatro preparações (pomada, gel de natrosol, creme não-iônico e via oral). A Fig 17 demonstra seus efeitos no parâmetro edema de orelha, sempre comparando o grupo tratado com o veículo correspondente, aplicado junto com o óleo de cróton, a fim de verificar se esse seria capaz de alterar por si só. A pomada incorporada com o EHPV (10%) não só não reduziu o edema 6 h (17A) após a aplicação do OC, como também o veículo já foi capaz de alterar a espessura da orelha. O mesmo não ocorreu com o gel, ou seja, não houve interferência do veículo na espessura da orelha dos animais (17B). Mais ainda, nessa preparação farmacêutica, o EHPV foi capaz de diminuir a espessura em $57,3 \pm 6,2\%$ ($P < 0,01$) enquanto que o tacrolimo reduziu a níveis basais. Os animais do grupo creme (17C) não apresentaram alteração da espessura da orelha após administração do EHPV quando comparado ao grupo veículo. O mesmo foi visto na administração por via oral, a qual não reduziu a espessura da orelha dos animais (Fig 17D). Em todos esses ensaios o tacrolimo 0,1% foi usado como droga de referência e reduziu significativamente o edema, conforme mostrado na figura 17B e 17C (níveis similares aos basais) e 17D (redução de $99,5 \pm 2,4\%$).

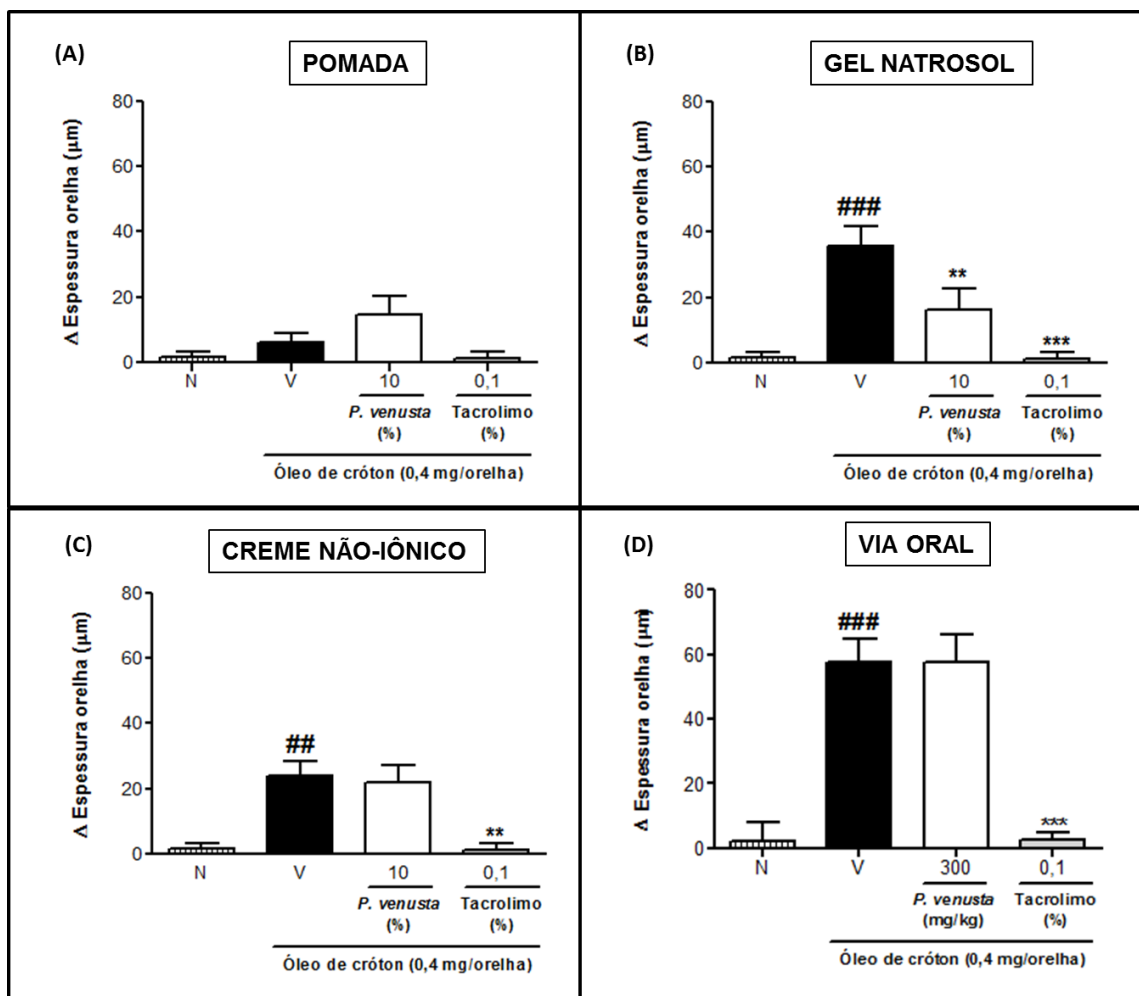


Figura 17. Avaliação da ação do extrato HE de *P. venusta* em diferentes preparações farmacêuticas no edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton. Efeito das preparações farmacêuticas incorporadas com EHPV, pomada (A), gel (B), creme (C) e via oral (D) no edema de orelha agudo induzido pela aplicação de OC. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=4-6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo veículo (V) e N representa o grupo não tratado. ###P<0,01 e ####P<0,001 (comparado com o grupo naive); **P<0,01 e ***P<0,001 (comparado com o grupo veículo).

Diferente do observado no experimento de edema de orelha, somente a administração do EHPV por via oral reduziu os níveis da atividade da enzima mieloperoxidase (Fig 18D), atingindo diminuição de $41 \pm 0,07\%$ ($P < 0,01$) e o tacrolimo redução de $97,5 \pm 0,03\%$ ($P < 0,001$). Essa enzima é utilizada como um indicativo de migração celular para o foco inflamatório.

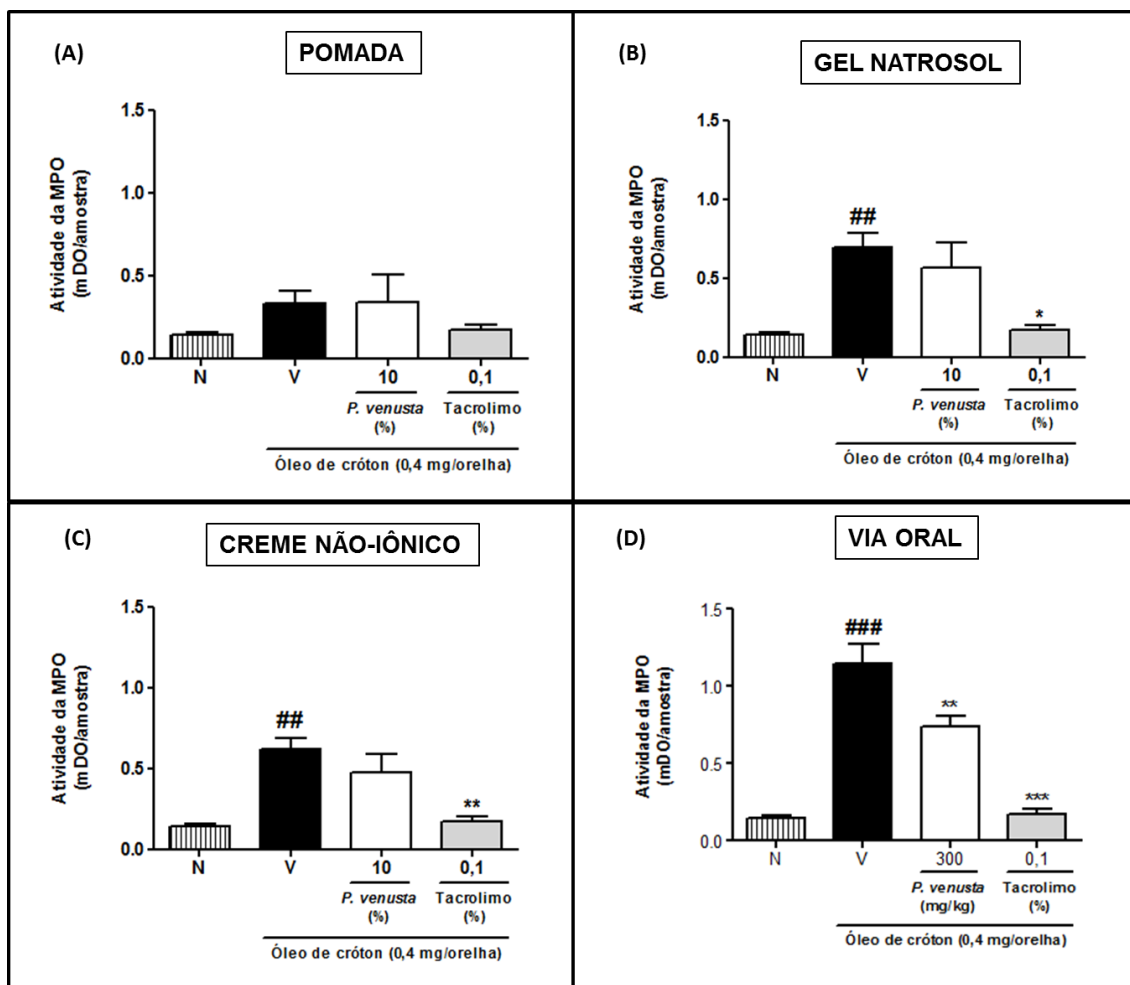


Figura 18. Avaliação da ação do extrato HE de *P. venusta* em diferentes preparações farmacêuticas na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no modelo agudo induzido por óleo de cróton. Efeito das preparações farmacêuticas incorporadas com EHPV, pomada (A), gel (B), creme (C) e via oral (D) na atividade da mieloperoxidase no modelo de edema de orelha agudo induzido pela aplicação de OC. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. ($n=4-6$). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo veículo (V) e N representa o grupo não tratado. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ (comparado com o grupo naive); ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (comparado com o grupo veículo).

6.2.2. Verificação dos efeitos de preparações farmacêuticas contendo EHPV em parâmetros inflamatórios induzidos por múltiplas aplicações de óleo de cróton em camundongos

O edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de OC é um modelo que mimetiza o processo inflamatório crônico, com características tais como edema, hiperproliferação de células epidermais e infiltração de células mononucleares. Conforme observado nas figuras 19, 20 e 21, a aplicação repetida de OC promoveu a formação de edema, verificada pelo aumento na espessura da orelha dos animais; além do aumento da atividade das enzimas MPO e NAG.

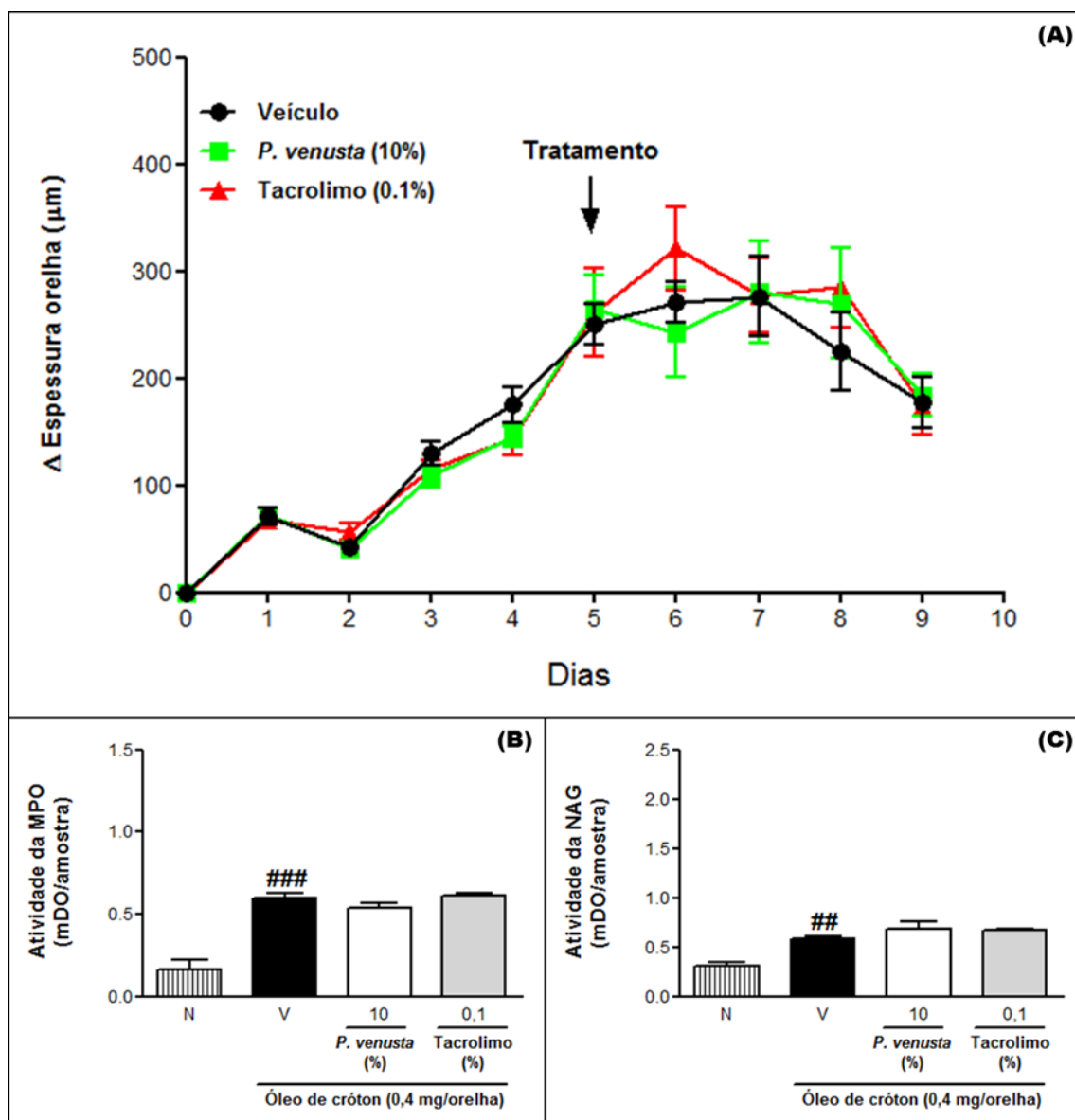


Figura 19. Efeitos do EHPV incorporado ao gel de natrosol no edema de orelha e atividades enzimáticas induzidos pela múltipla aplicação de óleo de croton. O óleo de croton (0,4 mg/orelha) foi aplicado em dias alternados durante 9 dias e gel de natrosol a 10% com o extrato HE da *P. venusta* foi aplicado topicamente no quinto dia, até o 9º dia, duas vezes ao dia. Edema (A) foi avaliado diariamente através da diferença na espessura medida da orelha direita dos animais e o valor basal da mesma. A atividade da MPO (B) e NAG (C) foram medidas no sobrenadante do homogenato das orelhas. O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Cada barra significa a média \pm E.P.M de 5-7 animais. Naïve (N): sem tratamento, veículo (V): gel de natrosol. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ (comparado ao grupo N).

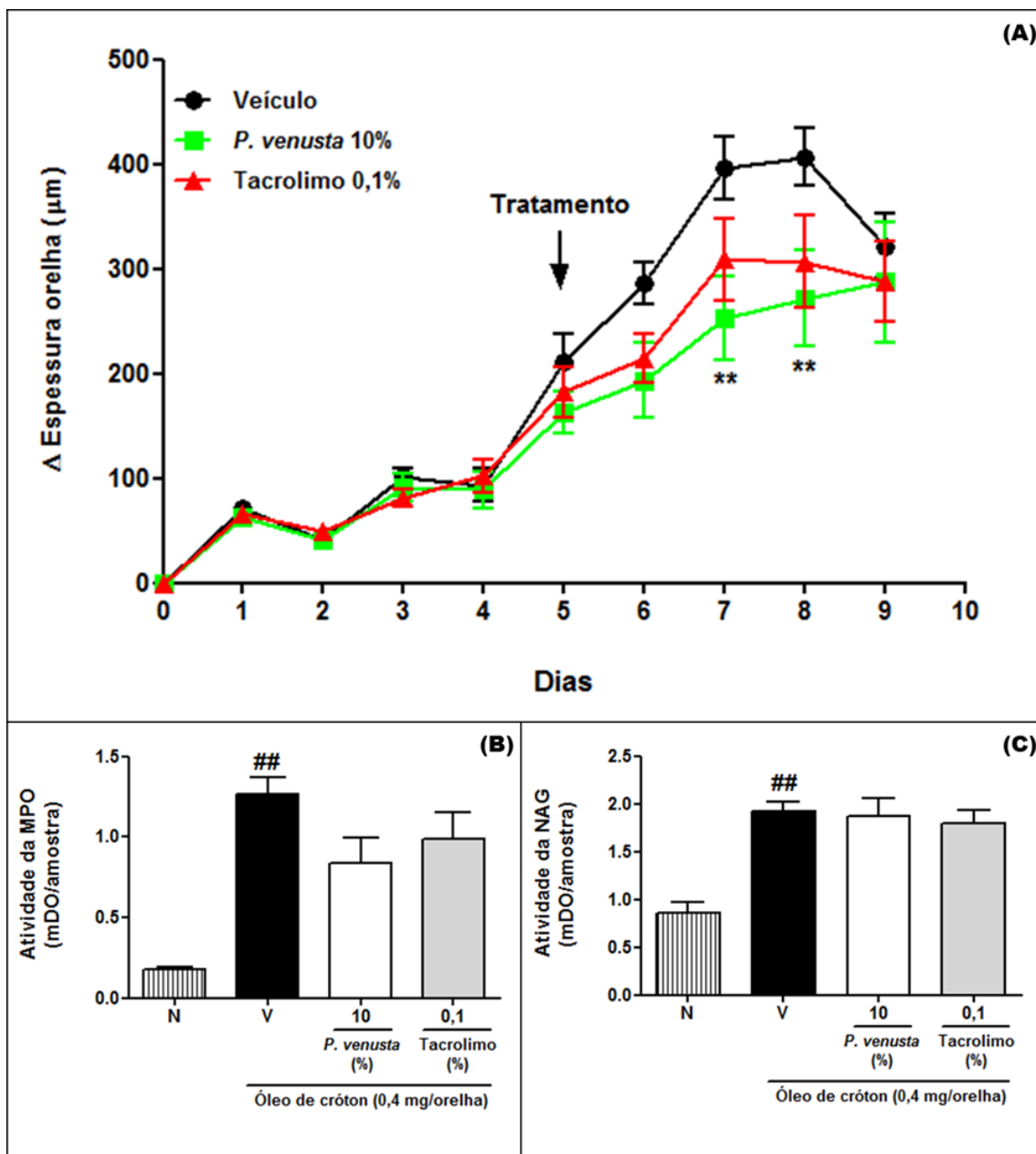


Figura 20. Efeitos do EHPV incorporado ao creme não-iônico no edema de orelha e atividades enzimáticas induzidos pela múltipla aplicação de óleo de croton. O óleo de croton (0,4 mg/orelha) foi aplicado em dias alternados durante 9 dias e o creme não-iônico a 10% com o extrato HE da *P. venusta* foi aplicado topicamente no quinto dia, até o 9° dia, duas vezes ao dia. Edema (A) foi avaliado diariamente através da diferença na espessura medida da orelha direita dos animais e o valor basal da mesma. A atividade da MPO (B) e NAG (C) foram medidas no sobrenadante do homogenato das orelhas. O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Cada barra significa a média \pm E.P.M de 5-7 animais. Naïve (N): sem tratamento, veículo (V): Creme não-iônico. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. $^{##}P < 0,01$ (comparado ao grupo N); $^{**}P < 0,01$ (comparado ao grupo V).

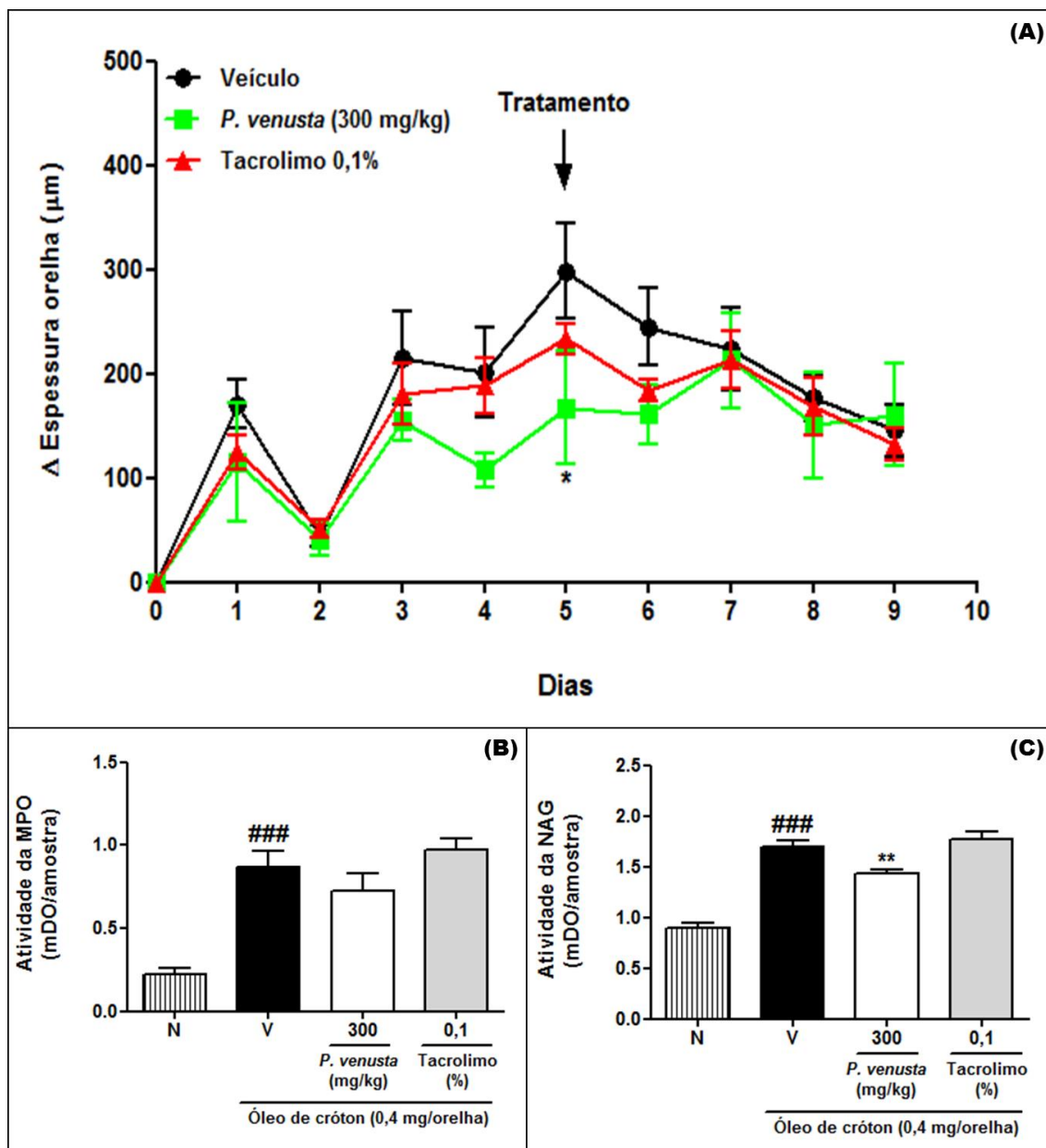


Figura 21. Efeitos do EHPV administrado por via oral no edema de orelha e atividades enzimáticas induzidos pela múltipla aplicação de óleo de croton. O óleo de croton (0,4 mg/orelha) foi aplicado em dias alternados durante 9 dias e o extrato HE da *P. venusta* (300 mg/kg) foi administrado no quinto dia, até o 9º dia, duas vezes ao dia. Edema (A) foi avaliado diariamente através da diferença na espessura medida da orelha direita dos animais e o valor basal da mesma. A atividade da MPO (B) e NAG (C) foram medidas no sobrenadante do homogenato das orelhas. O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Cada barra significa a média \pm E.P.M de 5-7 animais. Naïve (N): sem tratamento, veículo (V): Creme não-iônico. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. ###P<0,001 (comparado ao grupo N); *P<0,05 e **P<0,01 (comparado ao grupo V).

Na figura 19, observamos que a aplicação do gel de natrosol incorporado com *P. venusta* (10%) não alterou nenhum parâmetro avaliado:

edema de orelha (Fig 19A), atividade da enzima MPO (Fig 19B) e atividade da enzima NAG (Fig 19C).

O EHPV incorporado ao creme não-iônico (10%) foi capaz de inibir o edema induzido pela aplicação múltipla de OC nos dias 7 e 8 ($P < 0,01$), com uma inibição de $36,3 \pm 10\%$ ($P < 0,01$) e $33,2 \pm 11,4\%$ ($P < 0,01$), respectivamente (Fig 20A). No entanto, não alterou a atividade das enzimas MPO (Fig 20B) e NAG (Fig 20C).

Já com a administração por via oral do EHPV na dose de 300 mg/kg houve diminuição de $43,9 \pm 18,2\%$ ($P < 0,05$) do edema (Fig 21A) no dia 6 quando comparado ao grupo veículo. Somente essa preparação reduziu a atividade da enzima NAG (Fig 21B), um marcador de leucócitos mononucleares, em $32,5 \pm 5\%$ ($P < 0,01$).

Visto que o gel de natrosol incorporado com o extrato não foi capaz de alterar nenhum parâmetro desenvolvido pelo óleo de cróton, a continuidade do trabalho se deu somente com as preparações de *P. venusta* no creme não-iônico e com a *P. venusta* dada através de gavagem.

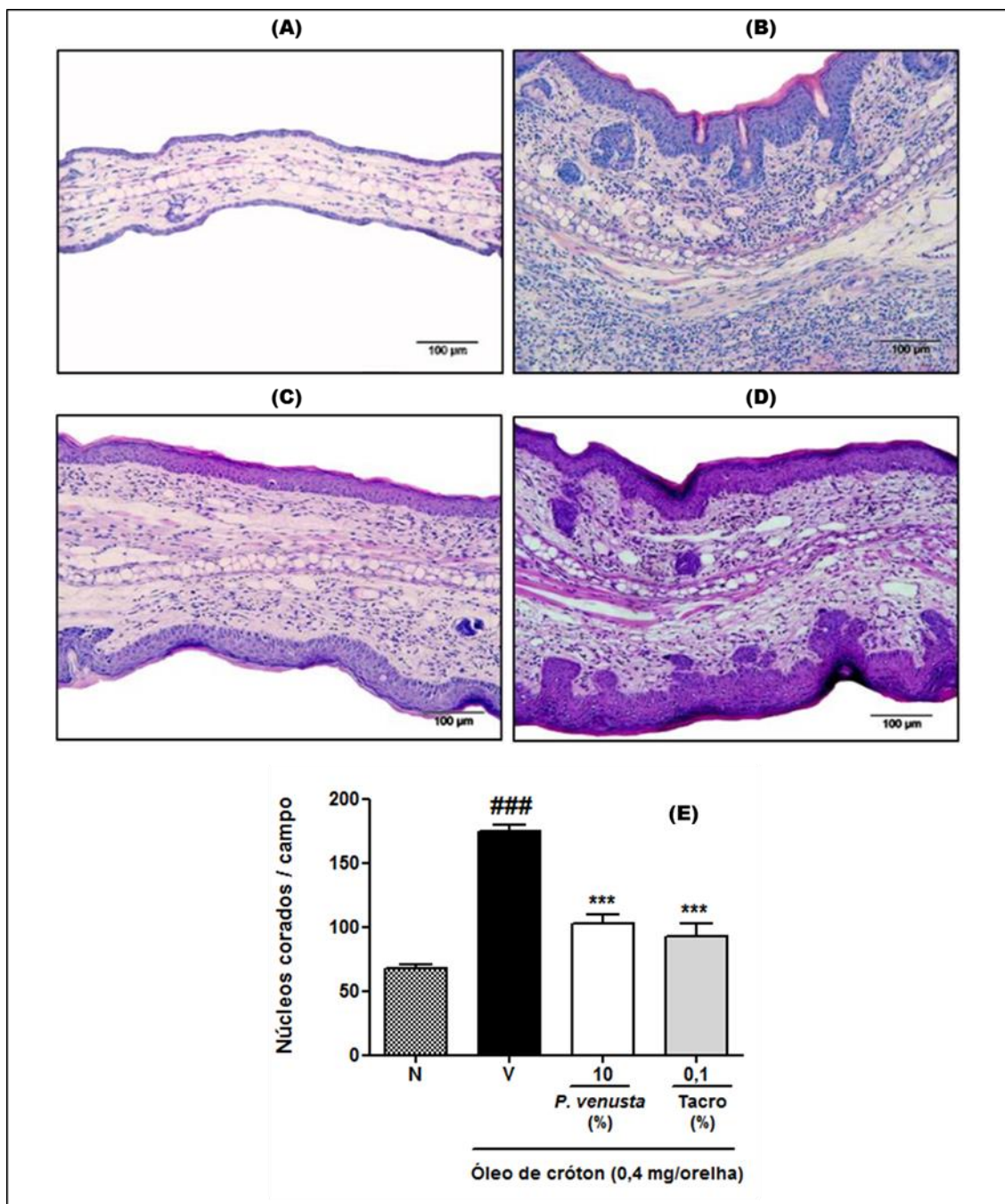


Figura 22. Efeito da *P. venusta* aplicada topicamente no infiltrado celular no modelo do óleo de croton. Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (200x, escala 100 μm) 9 dias após o tratamento com a aplicação múltipla de óleo de cróton. (A) Naïve, (B) Óleo de cróton, (C) tratamento tópico com creme não-iônico incorporado com 10% do extrato HE da *P. venusta* e (D) tacrolimo 0,1% (droga de referência). (E) Avaliação do infiltrado celular através da medida dos núcleos corados. Naïve (N): sem tratamento, veículo (V): Creme não-iônico. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. ### $P < 0,001$ (comparado ao grupo N); *** $P < 0,001$ (comparado ao grupo V).

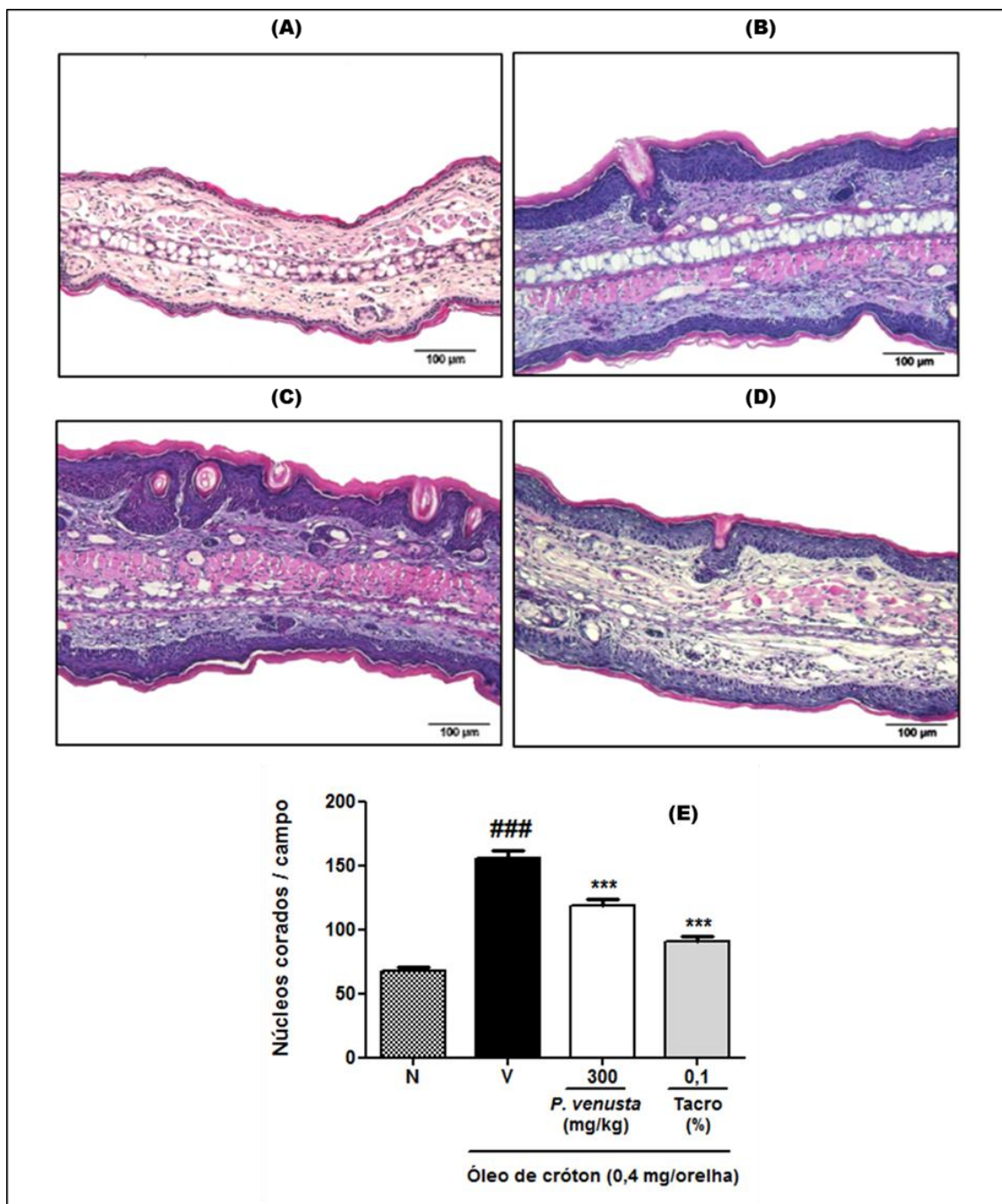


Figura 23. Efeito da *P. venusta* administrada por via oral no infiltrado celular no modelo do óleo de croton. Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (200x, escala 100 µm) 9 dias após o tratamento com a aplicação múltipla de óleo de cróton. (A) Naïve, (B) Óleo de cróton, (C) tratamento oral (300 mg/kg) do extrato HE da *P. venusta* e (D) tacrolimo 0,1% (droga de referência). (E) Avaliação do infiltrado celular através da medida dos núcleos corados. Naïve (N): sem tratamento, veículo (V): água. Cada barra representa a média ± E.P.M. de 5 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. ###P<0,001 (comparado ao grupo N); ***P<0,001 (comparado ao grupo V).

Como mostrado na figura 22, as preparações histológicas teciduais mostraram que aplicações repetidas com óleo de croton somado ao creme (Fig 22B) causaram infiltração celular intensa, quando comparado com o grupo naïve (Fig 22A), *P. venusta* 10% (Fig 22C) e tacrolimo 0,1% (Fig 22D). A *P. venusta* reduziu esse parâmetro inflamatório (Fig 22E) em $67,7 \pm 7,1\%$ ($P < 0,001$) e tacrolimo em $76,5 \pm 8,9\%$ ($P < 0,001$).

De forma bastante similar, a avaliação histológica mostrada na figura 23 mostrou que aplicações repetidas com óleo de croton juntamente com administração por via oral (Fig 23B) causaram infiltração celular intensa, quando comparado com o grupo naïve (Fig 23A), *P. venusta* 300 mg/kg (Fig 23C) e tacrolimo 0,1% (Fig 23D). A *P. venusta* reduziu esse parâmetro inflamatório (Fig 23E) em $42,3 \pm 5,9\%$ ($P < 0,001$) e tacrolimo em $73,8 \pm 4\%$ ($P < 0,001$).

Os níveis de citocinas nas amostras de pele foram maiores nas orelhas que foram tratadas com OC quando comparado com o grupo naïve. Como mostrado na figura 24, o creme incorporado com 10% de *P. venusta* não foi capaz de diminuir a elevação dos níveis de IL-1 β (Fig 24A), IL-6 (Fig 24B) e TNF- α (Fig 24C) produzidos pela ação do OC. Nessa avaliação, somente o tacrolimo diminuiu as concentrações de IL-1 β (24D) e TNF- α (24F). A inibição de IL-1 β promovida pela droga de referência foi de $70,9 \pm 7,1\%$ ($P < 0,05$), enquanto que os níveis de TNF- α alcançaram níveis basais, similares àqueles encontrados em animais que não foram tratados com OC.

O extrato HE da *P. venusta* administrado por via oral (300 mg/kg) alterou os níveis de todas as citocinas. IL-1 β (Fig 24D) foi inibida em $44,1 \pm 9,7\%$ ($P < 0,01$); IL-6 (Fig 24E) em $71,9 \pm 22,2\%$ ($P < 0,05$) e TNF- α (Fig 24F).

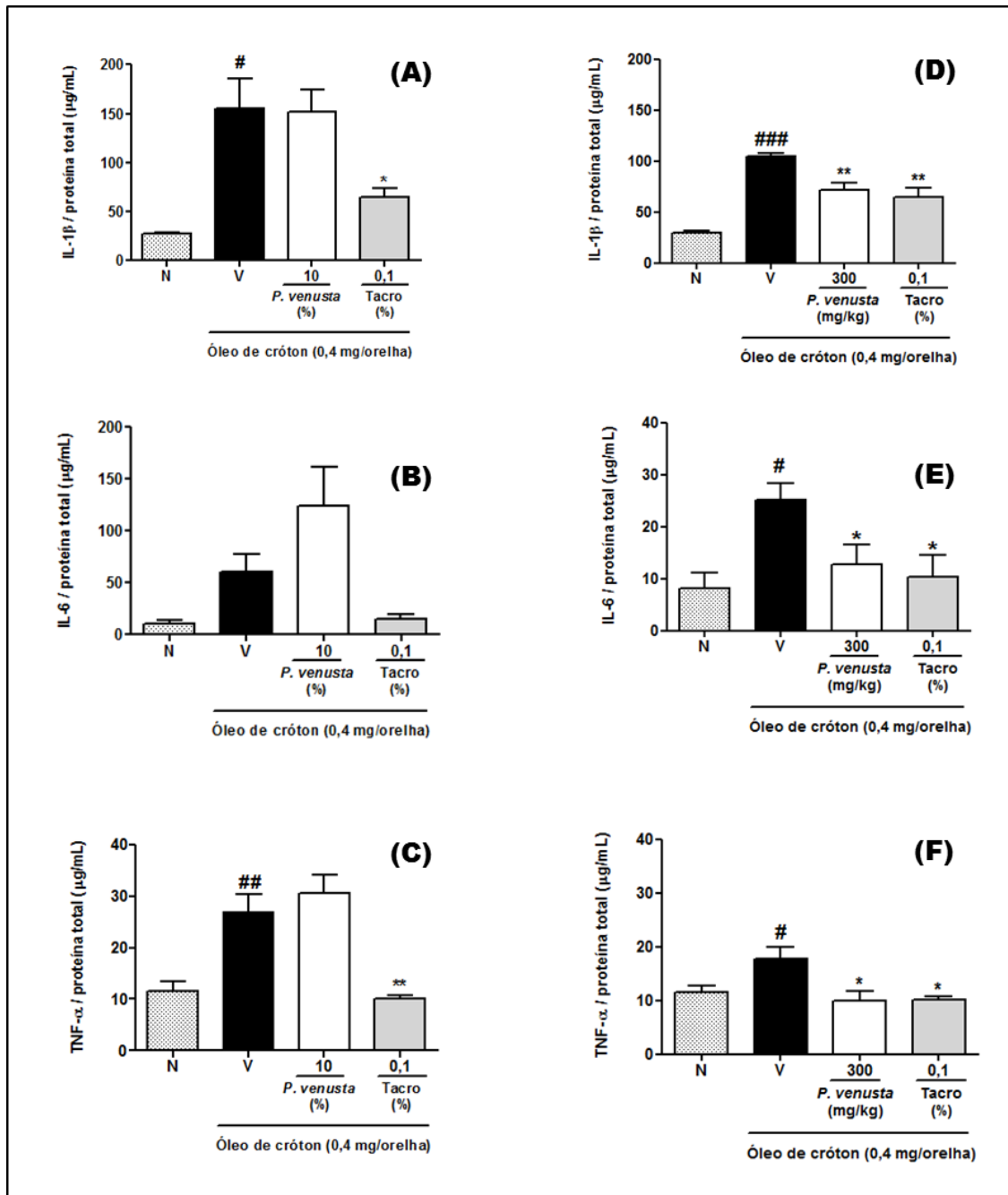


Figura 24. Avaliação dos níveis de citocinas nos animais submetidos ao modelo do óleo de cróton. A mensuração dos níveis de IL-1 β (A, D), IL-6 (B, E) e TNF- α (C, F) foram realizados em orelhas dos animais através do modelo por múltiplas aplicações de OC. Os níveis das citocinas foram avaliados após tratamento com *P. venusta* a 10% (A, B e C) e *P. venusta* na dose de 300 mg/kg (D, E e F). O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Naïve (N): sem tratamento, veículo (V): Creme não-iônico ou água. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. [#]P<0,05, ^{##}P<0,01, ^{###}P<0,001 (comparado ao grupo N); ^{*}P<0,05, ^{**}P<0,01 (comparado ao grupo V).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) foram detectadas através da sonda fluorescente DCFH-DA. Conforme a figura 25, somente a *P. venusta* incorporada ao creme não-iônico (Fig 25A) foi capaz de reduzir o aumento dos níveis intracelulares, alcançando níveis equivalentes ao grupo naíve. Quando administrado por via oral (Fig 25B), o extrato não foi capaz de alterar a quantidade produzida de EROs. Diferente do esperado, a vitamina E não alterou os níveis.

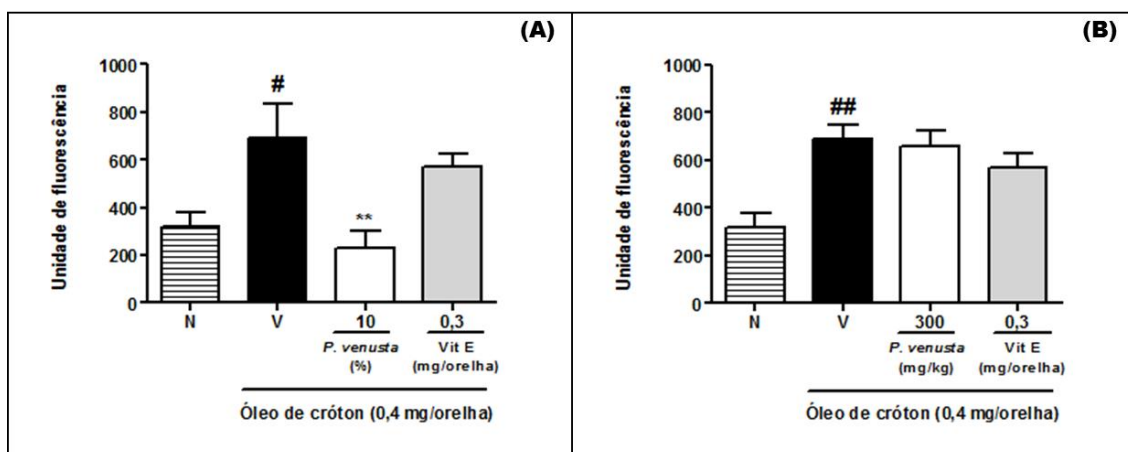


Figura 25. Avaliação das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos animais submetidos ao modelo de múltiplas aplicações de óleo de cróton. A avaliação dos níveis de EROs intracelulares foi realizada no sobrenadante do homogenato tecidual no modelo de múltiplas aplicações de OC e tratados com *P. venusta* 10% (A) e 300 mg/kg (B). As orelhas foram incubadas com DCFH-DA (2 mM) e os resultados foram expressos como unidade de fluorescência. A vitamina E (0,3 mg/kg) foi usada como controle negativo. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5-8 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ (comparado ao grupo N); ** $P < 0,01$ (comparado ao grupo V).

Com os modelos do óleo de cróton, modelo agudo e modelo por múltiplas aplicações, pudemos observar resultados interessantes da ação da *P. venusta*.

Visto que o vitiligo é uma doença complexa e, apesar de algumas características serem mimetizadas nos modelos anteriores, foi necessário o uso de animais que produzem melanina. Por essa razão, a próxima etapa foi realizada em animais C57BL/6.

6.2.3. Verificação dos efeitos de preparações farmacêuticas contendo EHPV em parâmetros inflamatórios induzidos por múltiplas aplicações de monobenzona (modelo de vitiligo) em camundongos

Após a aplicação tópica do creme com 40% de monobenzona, pequenas manchas brancas aparecem na área exposta à droga, mais especificamente, houve surgimento de pelos brancos (Fig 26A) na região do dorso próxima à cauda do animal. Gradualmente houve expansão para regiões próximas e algumas partes brancas surgiram em locais não-expostos, como cílios (Fig 26B), abdômen (Fig 26C), cauda (Fig 26D) e outros locais do próprio dorso.

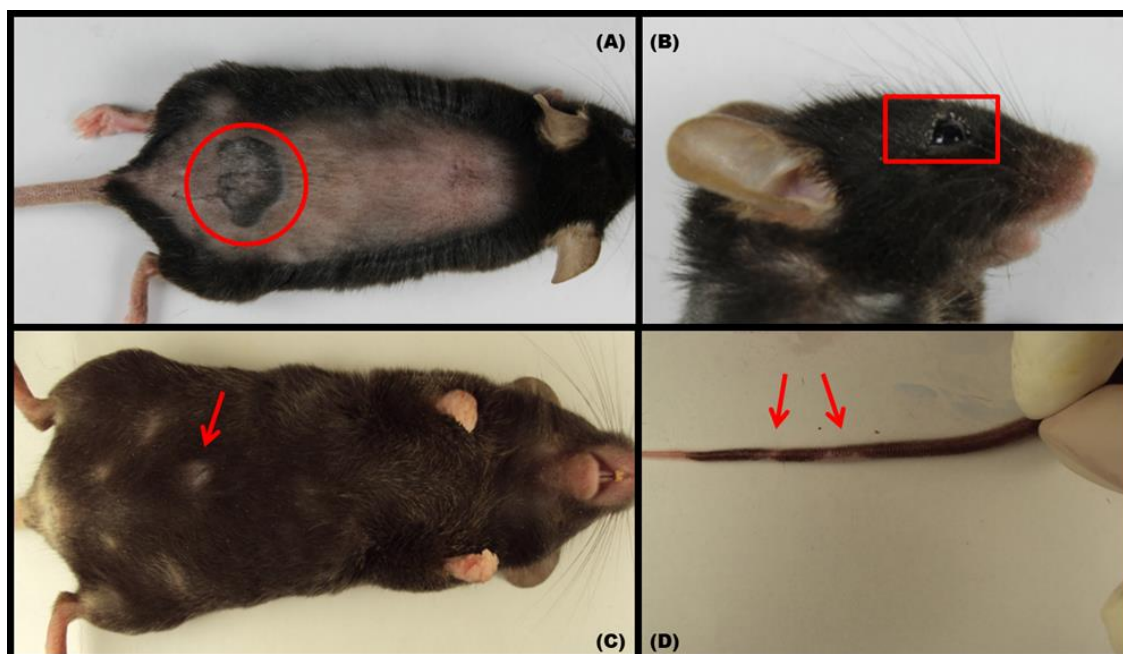


Figura 26. Determinação do efeito despigmentante induzido pelo modelo da monobenzona em camundongos e ação da *P. venusta* sobre esse modelo. Durante 50 dias os camundongos da linhagem C57BL/6 receberam monobenzona a 40% (incorporada em creme não-iônico) em locais específicos do dorso (indução). Os animais foram tratados com *P. venusta* por via oral (300 mg/kg) ou por via tópica (10%), uma vez ao dia, durante todo o período da indução e por 15 dias após a indução. O tacrolimo (0,1%) foi administrado por via tópica. A pigmentação desses animais foi avaliada semanalmente. No dia 65, o grau de despigmentação foi avaliado (A) no local de aplicação da monobenzona (círculo vermelho) e (B, C e D) em locais diferentes do local de aplicação da monobenzona (círculos e setas vermelhas). Os animais foram divididos nos grupos: controle (água ou creme não-iônico); *P. venusta* (10%), *P. venusta* (300 mg/kg) e tacrolimo (0,1%). Todos os animais receberam monobenzona durante os primeiros 50 dias. Todos os animais foram tratados por 65 dias. Naïve (N): animais que não receberam nenhum tratamento. N= 4-7 animais.

No dia 65, o grau de despigmentação dos grupos foi avaliado por dois experimentadores (Tabela 1). Todos animais do grupo controle (C) apresentaram despigmentação no local de aplicação da monobenzona (100% dos animais). Dos camundongos dos grupos da *P. venusta* (300 mg/kg), somente metade dos animais apresentaram despigmentação ($P < 0,05$); já no grupo *P. venusta* 10%, somente 20% dos animais apresentaram despigmentação no local de aplicação ($P < 0,01$). O tacrolimo (droga de referência) não foi capaz de atingir esses percentuais obtidos com o extrato, ou seja, 85,7% dos animais desenvolveram despigmentação. Esses valores apresentados somente se referem à presença ou ausência da despigmentação no animal. A extensão da despigmentação não foi avaliada.

Tabela 1. Determinação do efeito despigmentante induzido pelo modelo da monobenzona em camundongos e ação da *P. venusta* sobre esse modelo. A incidência de despigmentação foi avaliada no local de aplicação e em outros locais (diferentes do local de aplicação). Os dados foram avaliados através de qui-quadrado (dados não-paramétricos). Todos os grupos foram comparados com o grupo controle (animais tratados somente com monobenzona a 40%). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

<u>Animais com despigmentação (%)</u>	
<i>Local de aplicação</i>	
<i>P. venusta</i> (300 mg/kg)	50 *
<i>P. venusta</i> (10%)	20 **
Tacrolimo (0,1%)	85,7
<i>Outro local de aplicação</i>	
<i>P. venusta</i> (300 mg/kg)	33,3 **
<i>P. venusta</i> (10%)	40 *
Tacrolimo (0,1%)	42,9 *

Já com relação à despigmentação em outros locais diferentes do local de aplicação, novamente todos os animais do grupo controle apresentaram despigmentação (100%). De forma similar à apresentada anteriormente, somente 33% ($P < 0,01$) e 40% ($P < 0,05$) dos animais dos grupos tratados com

P. venusta 300 mg/kg e 10%, respectivamente, mostraram despigmentação. O tacrolimo mostrou despigmentação em 42,9% dos animais do seu grupo ($P < 0,05$).

Uma vez que o grau de despigmentação foi diferente para todos os grupos testados, a concentração de melanina foi avaliada nas amostras de pele dos dorsos (Fig 27A e 27B) e caudas (Fig 27C e 27D). Nenhuma alteração foi encontrada nas epidermes provenientes dos dorsos dos camundongos; no entanto, todos os grupos apresentaram diferenças no conteúdo de melanina nas amostras das caudas dos animais. Como observado na figura 27C, o grupo controle apresentou redução nos níveis de melanina de $44,3 \pm 11,6\%$ ($P < 0,01$) quando comparado com os animais do grupo naïve. Essa redução não foi encontrada nos grupos tratados com *P. venusta* 10% e tacrolimo (0,1%), os quais mostraram níveis de melanina maiores do que o grupo controle; $100 \pm 16,9\%$ ($P < 0,01$) e $116,5 \pm 13\%$ ($P < 0,01$), respectivamente. Esses resultados mostram que, no final do experimento, os animais tratados com *P. venusta* (10%) possuíam duas vezes mais melanina do que os animais não tratados.

Na figura 27C, pode-se observar que o grupo controle apresentou redução de $33,2 \pm 9,1\%$ ($P < 0,05$) no conteúdo de melanina comparado ao grupo naïve. Quando dada por via oral (Fig 27C), a *P. venusta* (300 mg/kg) mostrou $46,2 \pm 9,8\%$ ($P < 0,05$) e o tacrolimo $74,0 \pm 10,4\%$ ($P < 0,01$), representando 1,5 vezes mais melanina no grupo *P. venusta* do que no grupo controle.

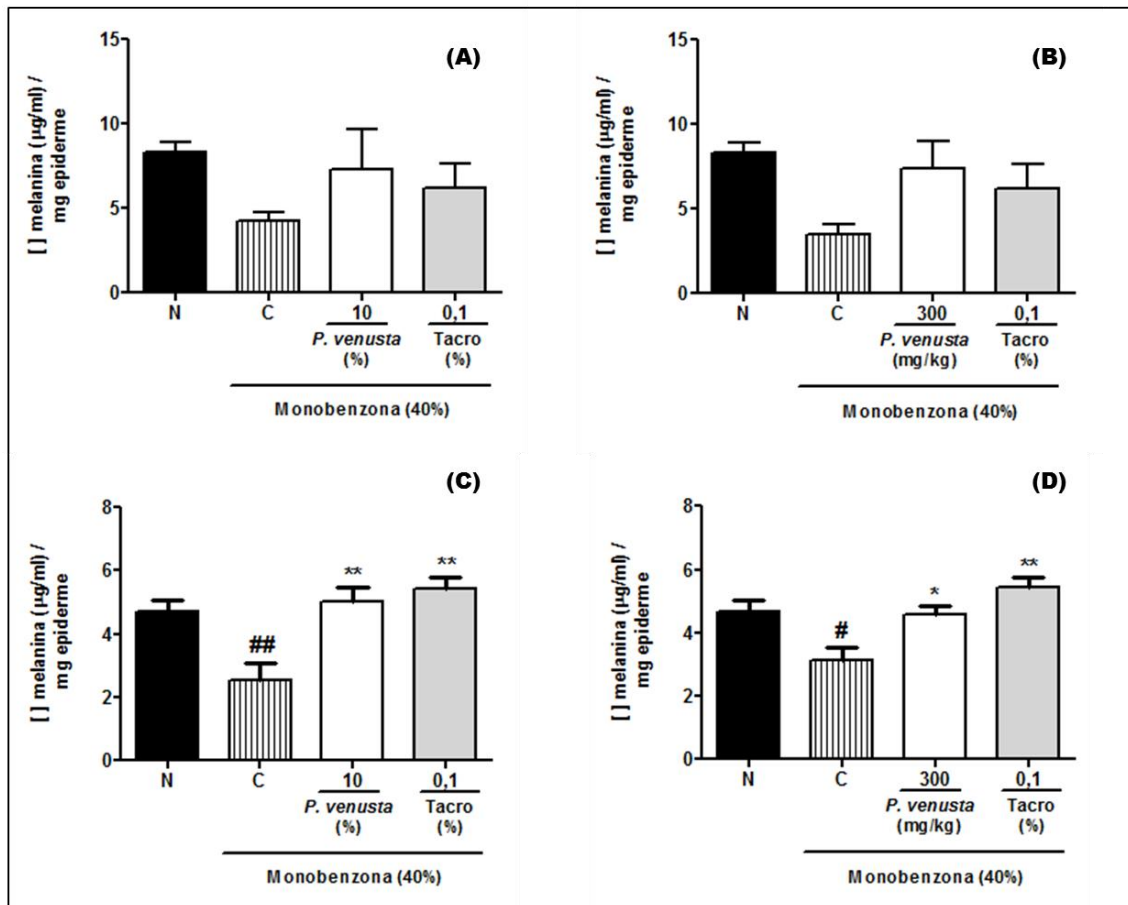


Figura 27. Efeitos nos níveis da melanina epidermal após tratamento com *P. venusta* no modelo da monobenzona. Após 65 dias, os animais C57BL/6 foram eutanasiados e as epidermes dos seus dorsos (A e B) e caudas (C e D) foram separadas para determinar o conteúdo de melanina dessas amostras. Os efeitos (A, C) da *P. venusta* (10%) e (B, D) *P. venusta* (300 mg/kg) foram investigados. O tacrolimo foi usado como droga de referência. Naïve (N): animais que não receberam nenhum tratamento. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ (comparado ao grupo N); * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (comparado ao grupo controle).

Sabendo que a pigmentação dos animais é dependente não só da melanina presente na epiderme, como também dos grânulos presentes nos folículos pilosos, também foi importante avaliar a pigmentação dermal dos grupos.

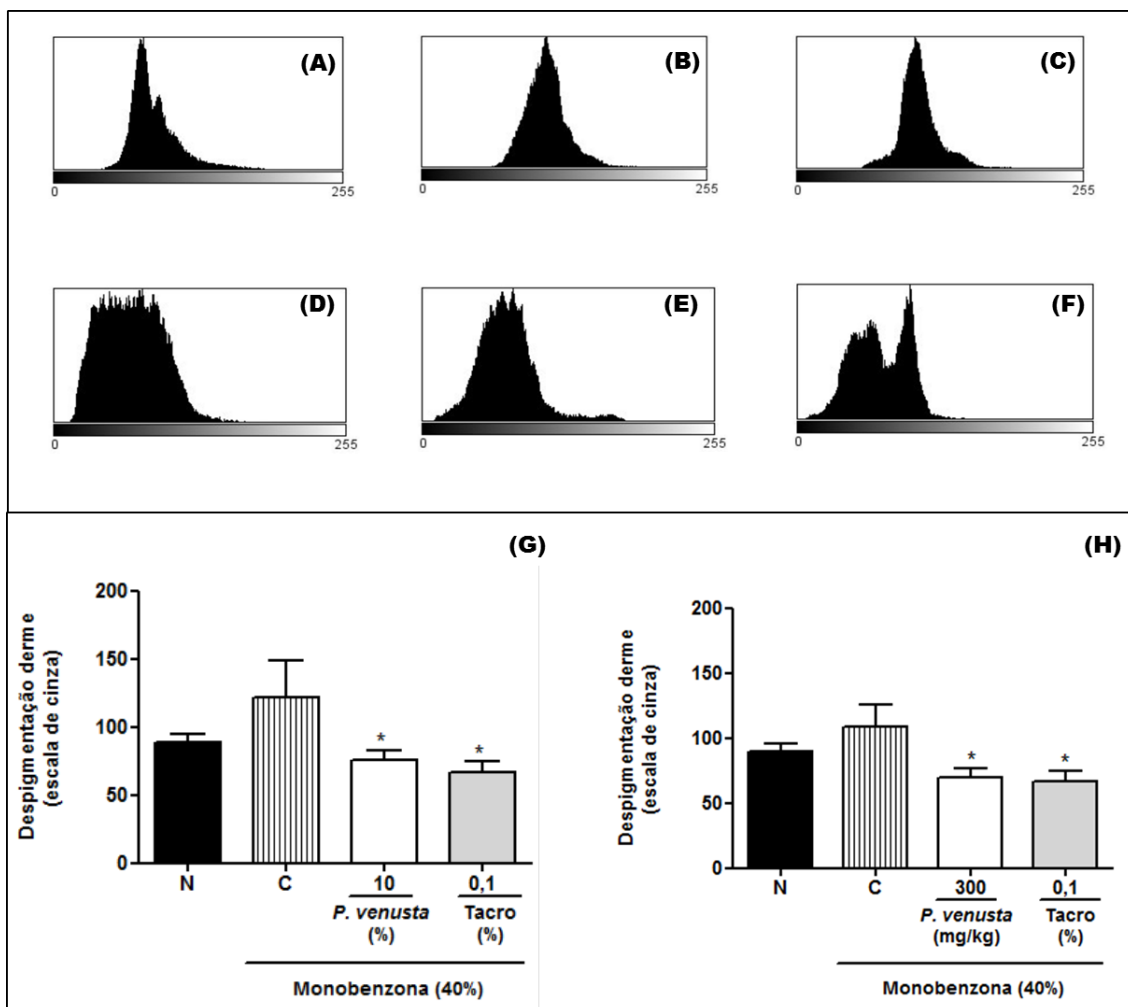


Figura 28. Efeitos na despigmentação dermal após tratamento com *P. venusta* no modelo da monobenzona. Após 65 dias os camundongos C57BL/6 foram eutanasiados. As dermes dos dorsos foram separadas e fotos foram tiradas. Em seguida, mudanças nas imagens resultantes para escala de cinza e histogramas foram gerados. (A) Naïve, (B e C) controle (água ou creme não-iônico), (D) *P. venusta* (10%), (E) *P. venusta* (300 mg/kg) e (F) tacrolimo (0,1%). Com exceção do grupo naïve (N), todos os animais receberam monobenzona (40%) durante 50 dias e tratamentos por 65 dias. Tacrolimo foi usado como droga de referência. Gráficos das médias de cada histograma por grupo foram avaliados para a (G) *P. venusta* 10% e (H) *P. venusta* 300 mg/kg. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. * $P < 0,01$ (comparado ao grupo controle). Escala de cinza: 0 (preto) – 255 (branco).

Para isso, após os animais serem eutanasiados, a derme foi separada da epiderme e fotos da região de aplicação da monobenzona foram tiradas em todos os animais de todos os grupos. A mesma área foi pré-determinada, alterada para tons de cinza e histogramas gerados. Cada barra representa o tom de cinza correspondente e sua frequência; a média é feita considerando todos os tons de cinza e sua frequência. Os histogramas representativos de

cada grupo foram mostrados nas figuras 28A (Naive), 28B (controle com água), 28C (controle com creme não-iônico), 28D (*P. venusta* 10%), 28E (*P. venusta* 300 mg/kg) e 28F (tacrolimo). Quanto maior a concentração do histograma no lado esquerdo, mais próximo do preto se encontra a média. De forma contrária, quanto mais próximo do lado direito, mais próximo do branco.

Assim, conforme mostrado na figura 28G, o tratamento com *P. venusta* a 10% apresentou diferença estatística de $38,2 \pm 6,2\%$ ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo controle, significando que há maior frequência próxima da cor preta após o tratamento com o extrato. O mesmo foi observado com a droga de referência, a qual mostrou $45,2 \pm 6,6\%$ ($P < 0,05$).

De forma bastante similar (Fig 23H), a *P. venusta* (300 mg/kg) e tacrolimo mostraram diferenças significativas de $36,0 \pm 6,7\%$ ($P < 0,05$) e $38,7 \pm 7,4\%$ ($P < 0,05$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

As EROs foram detectadas através da sonda fluorescente DCFH-DA. Conforme a figura 29, somente os dorsos dos animais tratados com monobenzona a 40% promoveram alteração das EROs (Fig 29A e 29B). Nas orelhas não foi observada diferença estatística dos tratamentos com (Fig 29C) *P. venusta* (10%) e (Fig 29D) *P. venusta* (300 mg/kg).

Na figura 24A, conforme esperado, a monobenzona reduziu as EROs em $70,3 \pm 12,5\%$ ($P < 0,05$) quando comparada com o grupo naïve. Os tratamentos com *P. venusta* a 10% e tacrolimo foram capazes de impedir essa redução ($P < 0,05$), exibindo $203,2 \pm 73,8\%$ e $248,0 \pm 37,0\%$ a mais de unidade de fluorescência, respectivamente. Isso significa que foram encontrados níveis de EROs nos tratamentos em 2 e 2,5 vezes mais do que nos animais do grupo controle, aproximadamente.

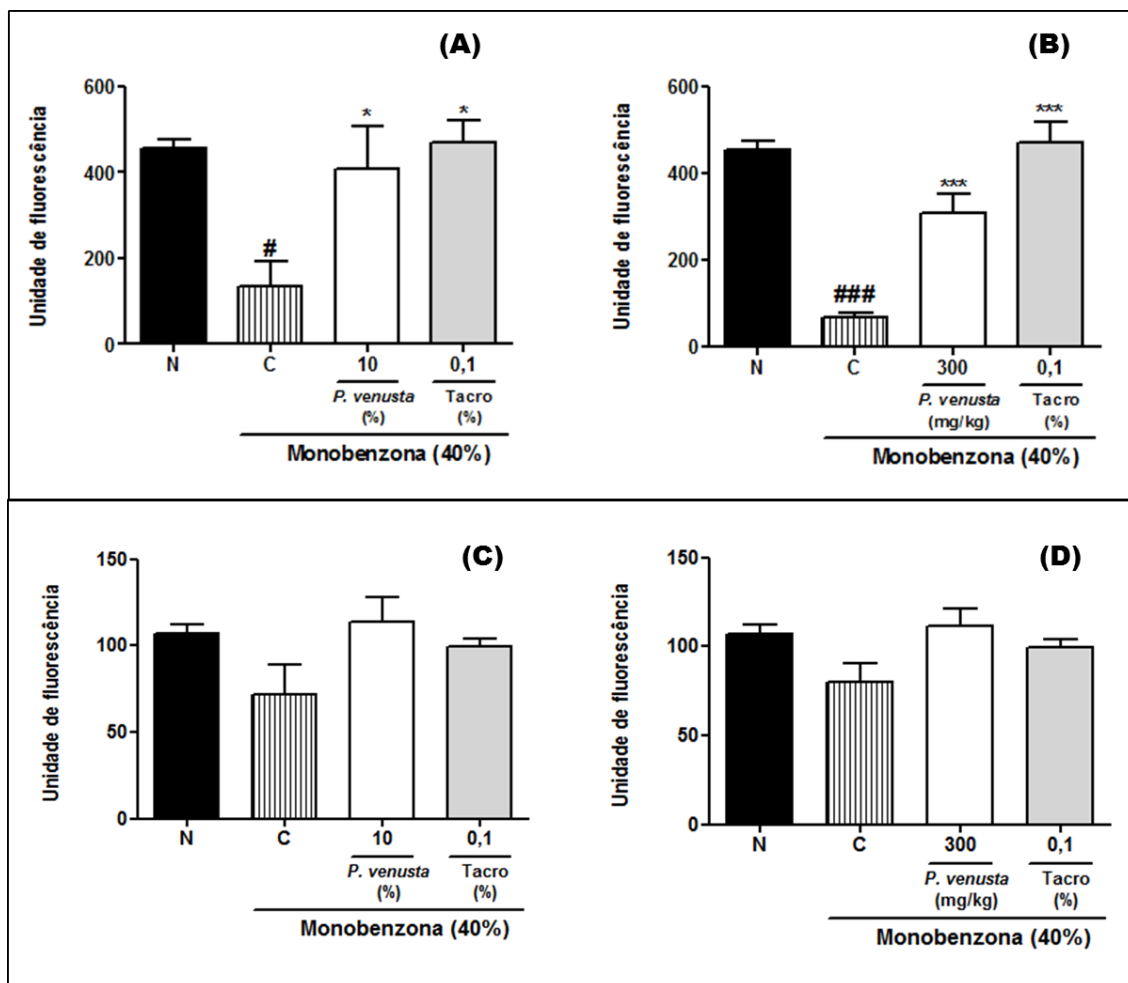


Figura 29. Avaliação das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos animais submetidos ao modelo do vitiligo. A avaliação dos níveis de EROs intracelulares foi realizada no sobrenadante do homogenato dos dorsos (A e B) e orelhas (C e D) dos animais que foram submetidos ao modelo de vitiligo e tratados com *P. venusta* 10% (A e C) e 300 mg/kg (B e D). Os tecidos foram incubados com DCFH-DA (2 mM) e os resultados foram expressos como unidade de fluorescência. O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ (comparado ao grupo N); * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ (comparado ao grupo controle - C).

Na figura 29B, similarmente ao resultado da figura 29A, os animais tratados com menobenzona a 40% (grupo controle) reduziram $85,3 \pm 2,8\%$ ($P < 0,001$) dos níveis de espécies reativas quando comparados aos animais do grupo naïve. Já para o grupo dos camundongos tratados com *P. venusta* (300 mg/kg), houve diferença de $364,7 \pm 64\%$ ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo controle, representando aproximadamente 3,6 vezes mais EROs. Já os animais tratados com a droga de referência, houve também uma diferença

bastante significativa, atingindo $605 \pm 75\%$ a mais de espécies reativas quando comparados com os animais do grupo controle ($P < 0,001$).

Os níveis de três citocinas pró-inflamatórias foram avaliados nos dorsos (Fig 30) e orelhas (Fig 31) dos animais que se submeteram à indução do vitiligo por monobenzona a 40%.

No dorso dos animais, o grupo controle não foi capaz de alterar nenhuma citocina avaliada. Além disso, tanto o tratamento com *P. venusta* 10% quanto o tratamento com *P. venusta* 300 mg/kg, não foram capazes de alterar os valores de IL-1 β (Fig 30A e 30D), IL-6 (Fig 30B e 30E), nem de TNF- α (Fig 30C e 30F).

Já nas orelhas avaliadas (Fig 31), de forma semelhante à anterior, os níveis de IL-1 β (Fig 31A e 31D) e IL-6 (Fig 31B e 31E) não foram alterados após o tratamento com *P. venusta* a 10% e *P. venusta* (300 mg/kg), respectivamente.

No entanto, os níveis de TNF- α foram aumentados para o grupo controle (Fig 31C) quando comparados aos animais do grupo naive, chegando ao aumento de $97,9 \pm 10,7\%$ ($P < 0,001$). O aumento desses níveis foi impedido após o tratamento com *P. venusta* 10%, a qual apresentou valores $99,2 \pm 12,1\%$ menores que o grupo controle. A droga de referência atingiu níveis similares aos basais ($P < 0,001$).

O mesmo foi visto na figura 31F. O grupo controle apresentou aumento dos níveis de TNF- α em $179,9 \pm 2,8\%$, o qual não foi verificado nos grupos tratados com *P. venusta* 300 mg/kg (Fig 26F). Esse tratamento reduziu em $68,2 \pm 5,9\%$ os níveis dessa citocina quando comparado com o grupo controle. Já o tacrolimo alcançou níveis basais, semelhantes aos animais que não foram expostos a nenhum tratamento.

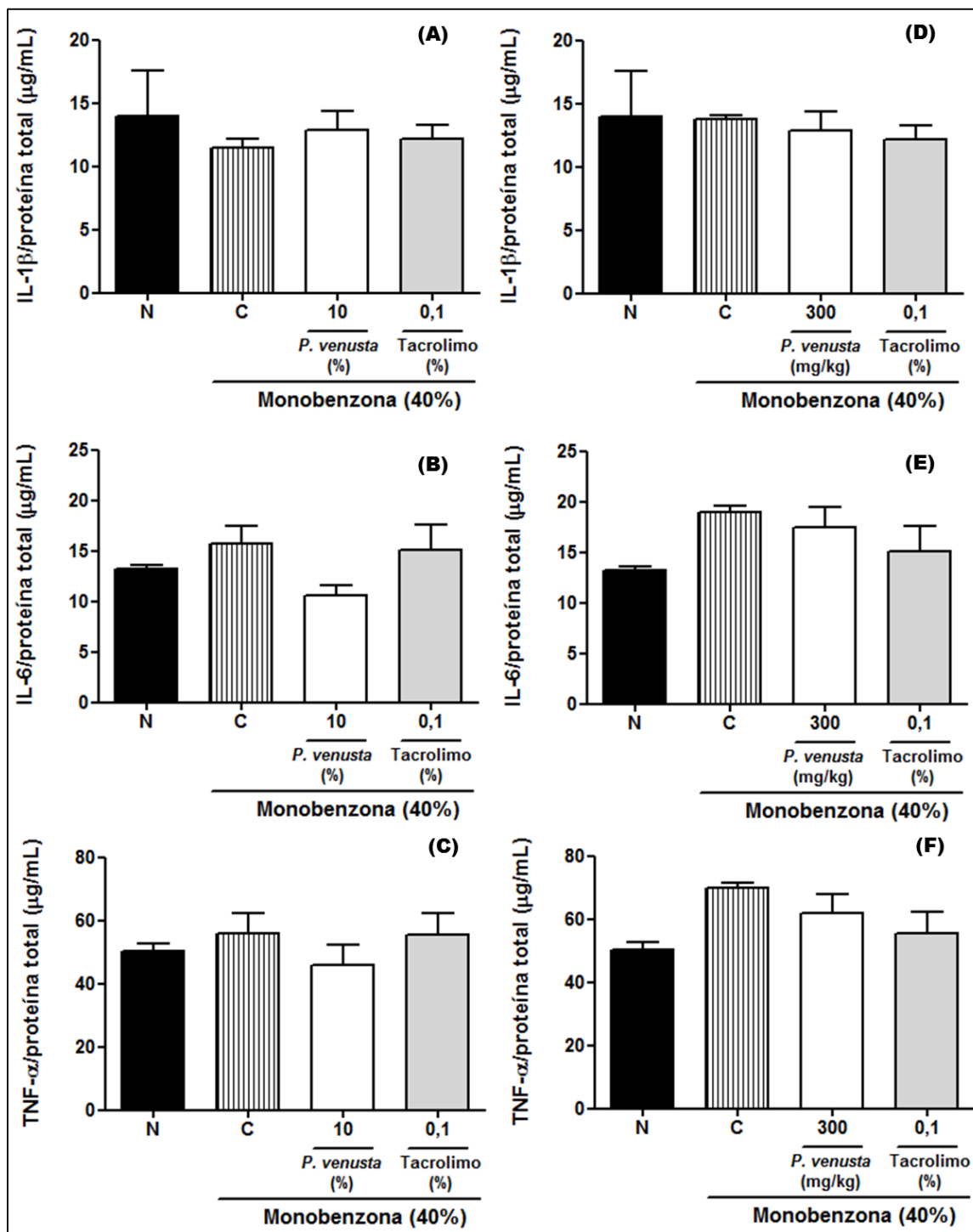


Figura 30. Níveis de citocinas avaliadas no dorso de animais induzidos por monobenzona. Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A, D), IL-6 (B, E) e TNF- α (C, F) foram realizados com Kit comercial de ELISA nos sobrenadantes dos homogenatos dos dorsos dos animais tratados com *P. venusta* 10% (A, B, C) e 300 mg/kg (D, E, F). O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais.

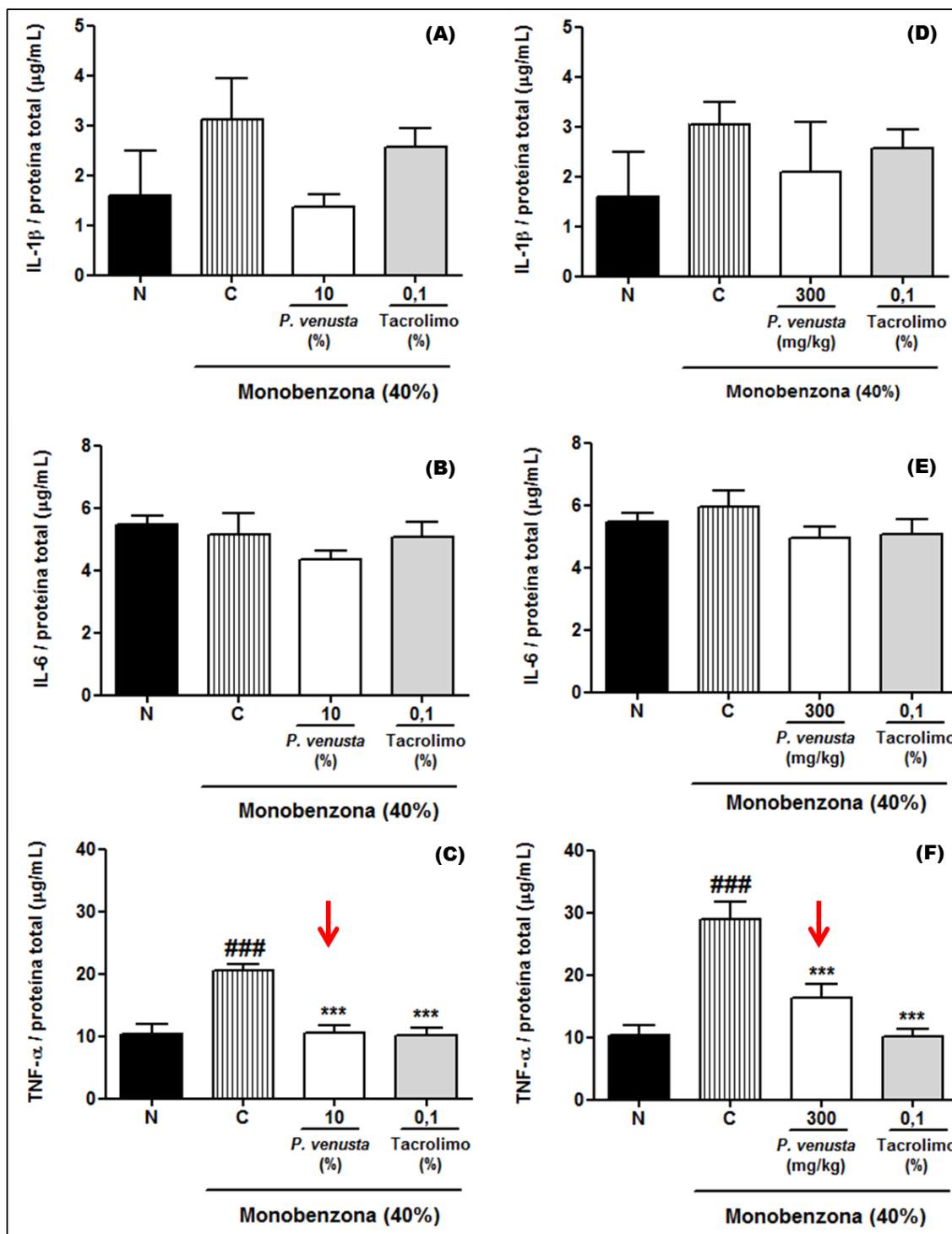


Figura 31. Níveis de citocinas avaliadas na orelha de animais induzidos por monobenzona. Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A, D), IL-6 (B, E) e TNF- α (C, F) foram realizados com Kit comercial de ELISA nos sobrenadantes dos homogenatos dos dorsos dos animais tratados com *P. venusta* 10% (A, B, C) and 300 mg/kg (D, E, F). O tacrolimo (0,1%) foi usado como droga de referência. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. ###P<0,001 (comparado ao grupo N); ***P<0,001 (comparado ao grupo controle - C).

As amostras dos dorsos foram coradas com hematoxilina-eosina e o infiltrado celular foi avaliado. Fotos representativas foram mostradas na figura 32A (Naïve), Fig 32B (controle: monobenzona), 32C (*P. venusta* 10%), Fig 32D (*P. venusta*, 300 mg/kg) and Fig 32E (tacrolimo). Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir o infiltrado celular em $94,3\% \pm 9,2\%$ (*P. venusta* 10%; $P < 0,001$) (Fig 32F) e redução total (Fig 32G) com *P. venusta* 300 mg/kg ($P < 0.001$). A droga de referência foi capaz de reduzir totalmente o infiltrado celular, atingindo níveis basais.

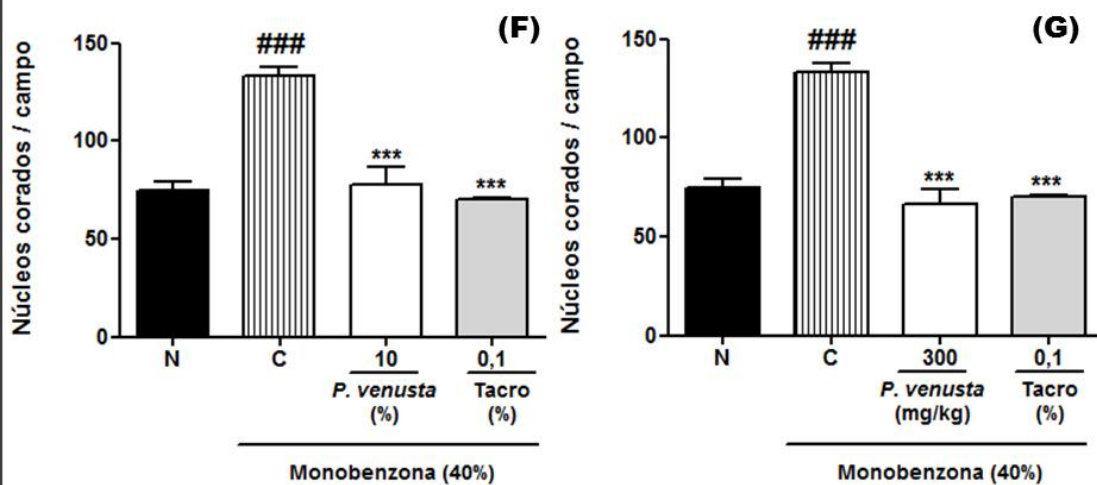
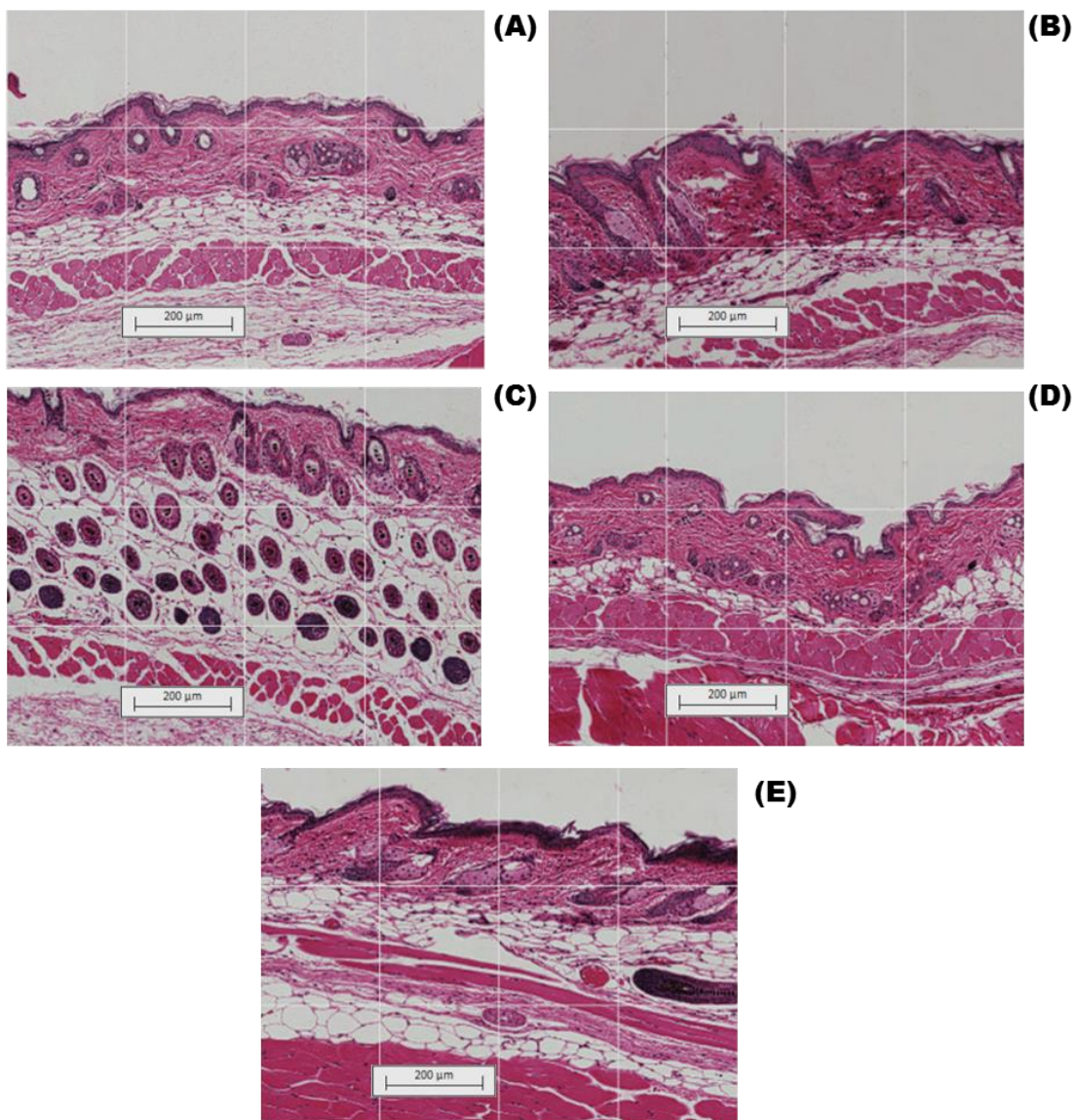


Figura 32. Avaliação histológica do infiltrado celular através da coloração de hematoxilina-eosina em animais submetidos ao modelo da monobenzona. O número de células infiltradas entre os grupos naïve (A), controle (B), *P. venusta* 10% (C), *P. venusta* 300 mg/kg (D) e tacrolimo (E) foram avaliados no dia 65. Fotos representativas dos cortes histológicos dos dorsos corados com HE indicam que o número de células coradas estava reduzido nos grupos da *P. venusta* 10% e tacrolimo (300X, scale 200 µm). *P. venusta* 10% (Fig. 11F) e 300 mg/kg (Fig 11G). Naïve: N (sem indução e tratamento), controle (C): monobenzona 40%. Cada barra representa a média ± E.P.M. de 4 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. ###P<0,001 (comparado ao grupo N); ***P<0,001 (comparado ao grupo controle - C).

Os grânulos de melanina nas amostras da pele do dorso foram coradas com Fontana-Masson (coloração marrom), evidenciadas na região dos folículos pilosos. Como observado nas fotos representativas (Fig 33), o grupo controle (Fig 33B) apresentou baixos níveis de melanina quando comparado ao grupo naïve (Fig 33A). *P. venusta* 10% (Fig 33C) e tacrolimo (Fig 33E) mostraram quantidades aumentadas do pigmento melanina. Por outro lado, a *P. venusta* dada oralmente (Fig 33C), não apresentou aumento (recuperação/proteção) da pigmentação (200X. Escala: 200 µm).

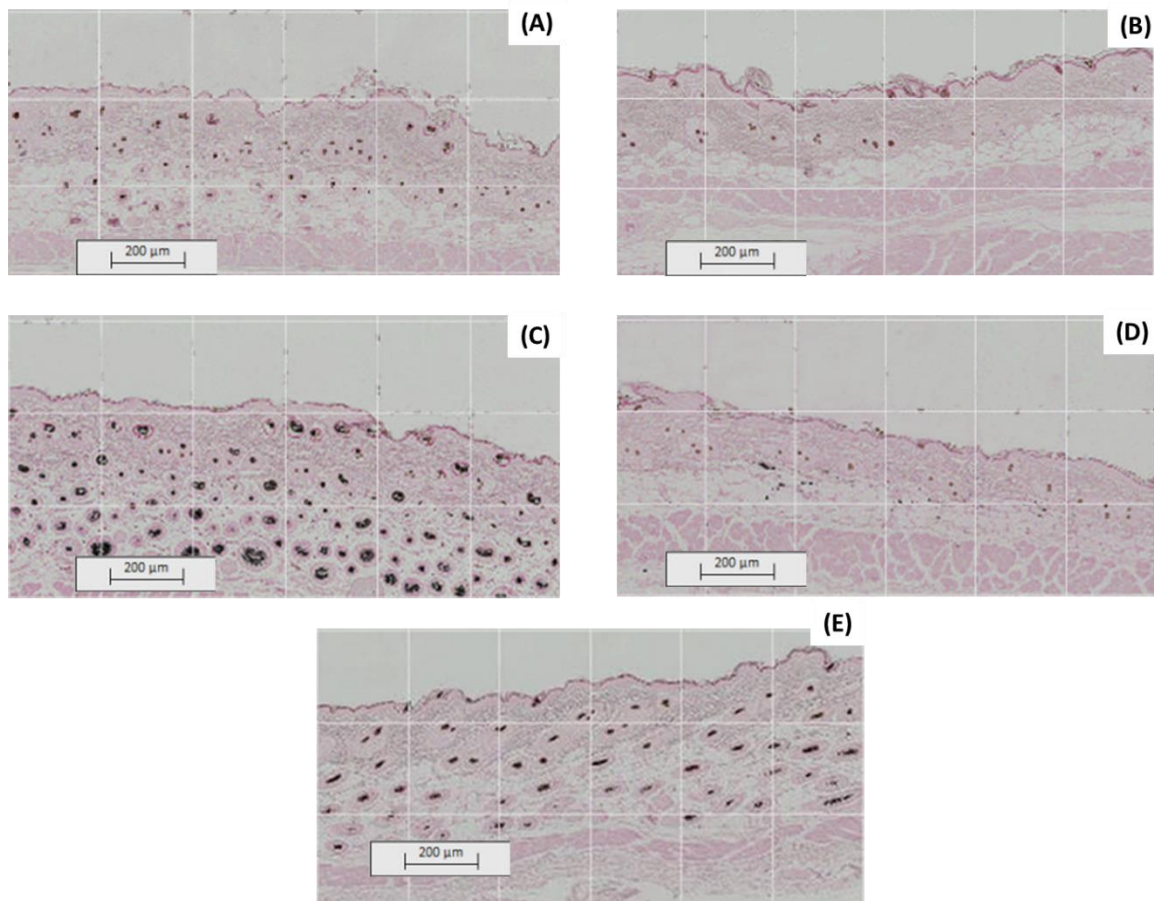


Fig 33. Avaliação histológica após marcação de melanina por coloração de Fontana-Masson. Fotos representativas do conteúdo de melanina para (A) grupo naïve, (B) grupo controle, (C) *P. venusta* 10%, (D) *P. venusta* 300 mg/kg e (E) tacrolimo foram alcançadas 65 dias após o início da indução por monobenzona a 40%. Os cortes dos dorsos corados com Fontana-Masson indicam que os níveis de melanina na epiderme e derme (200X, escala 200 µm). Naive (N): animais sem tratamento; controle (C): monobenzona a 40%.

6.2.4. Avaliação de possíveis efeitos adversos no modelo de vitiligo

Conforme visto na figura 34, nenhum grupo alterou o peso dos animais ao longo do experimento, bem como nenhum animal morreu em decorrência do tratamento.

Visto que a absorção das preparações farmacêuticas não foi avaliada, os órgãos dos animais foram retirados a fim de verificar se houve alterações tanto no peso quanto na morfologia de órgãos envolvidos direta ou indiretamente com o sistema imune ou com biotransformação de drogas. Conforme mostrado na figura 35, (B) timo e (C) baço foram avaliados e nenhuma alteração ponderal ocorreu. De forma semelhante, tanto no fígado (A) quanto nos rins (D) não houve qualquer modificação estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Além disso, não houve qualquer alteração morfológica quando os órgãos foram analisados visualmente (Fig 36).

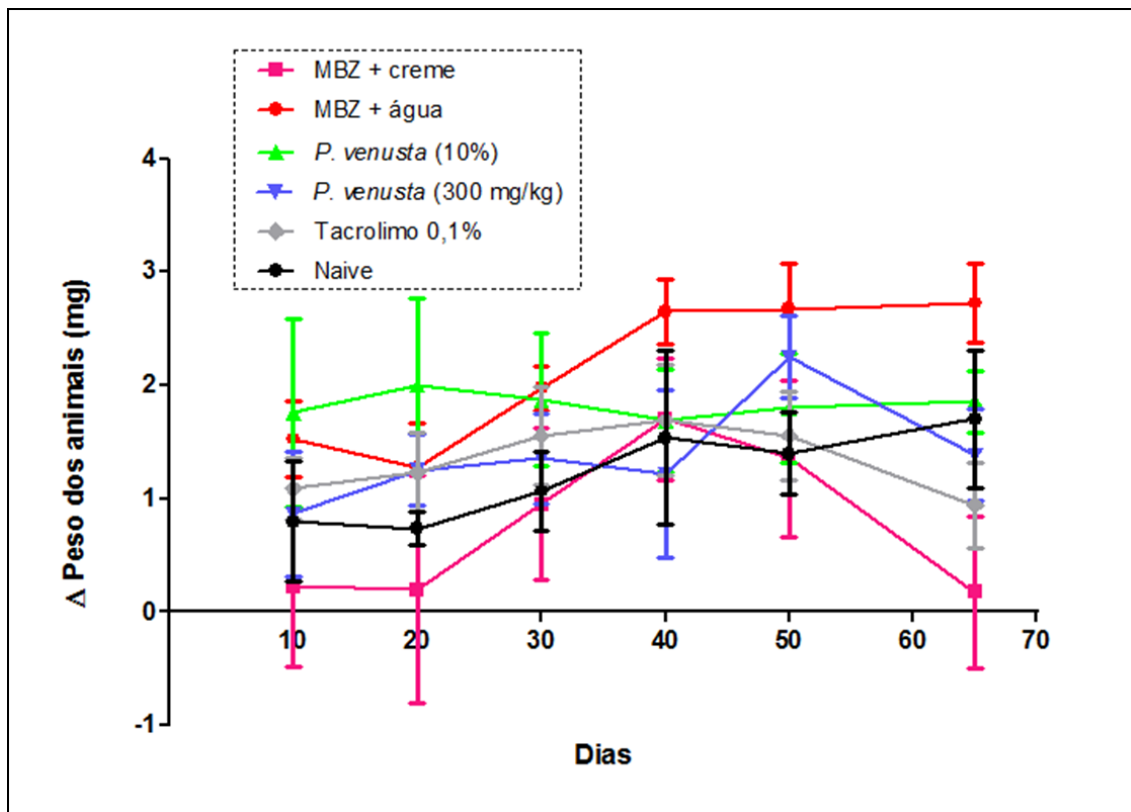


Figura 34. Avaliação do peso dos animais no modelo de vitiligo induzido por monobenzona e tratado com *P. venusta*. O peso dos animais dos grupos Naive (N), Monobenzona + creme, Monobenzona + água, *P. venusta* (10%), *P. venusta* (300 mg/kg) e tacrolimo foram avaliados durante 65 dias. Os resultados foram dados como a média da diferença entre o peso avaliado em cada tempo e o valor basal (dia 0).

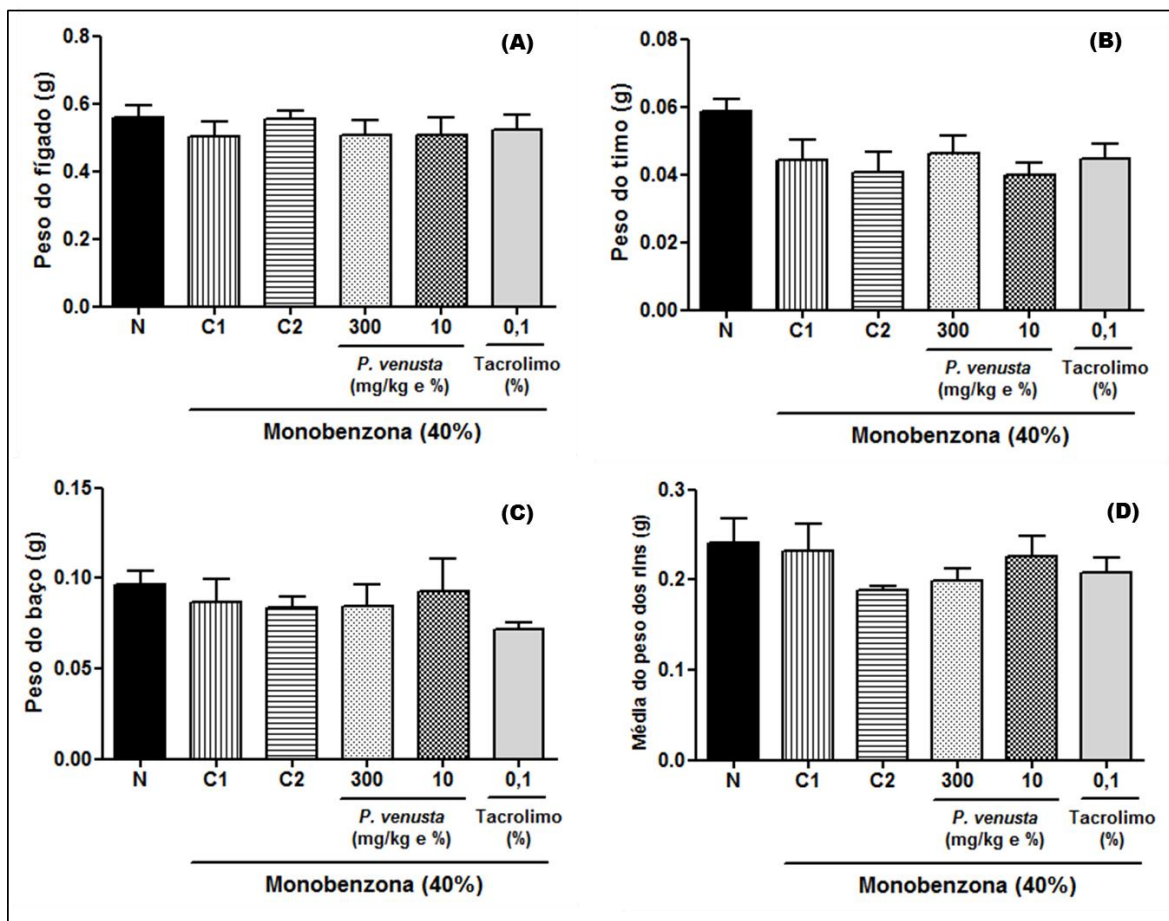


Figura 35. Avaliação do peso de órgãos dos animais no modelo de vitiligo induzido por monobenzona e tratado com *P. venusta*. O peso dos órgãos dos animais foram avaliados: (A) fígado, (B) timo, (C) baço, (D) rins. Naïve (N): animais que não receberam tratamento. C1: animais induzidos com monobenzona e tratados com água. C2: animais induzidos com monobenzona e tratados com creme não-iônico. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 4-7 animais. Os símbolos gráficos representam o nível de significância. $^{###}P < 0,001$ (comparado ao grupo N).

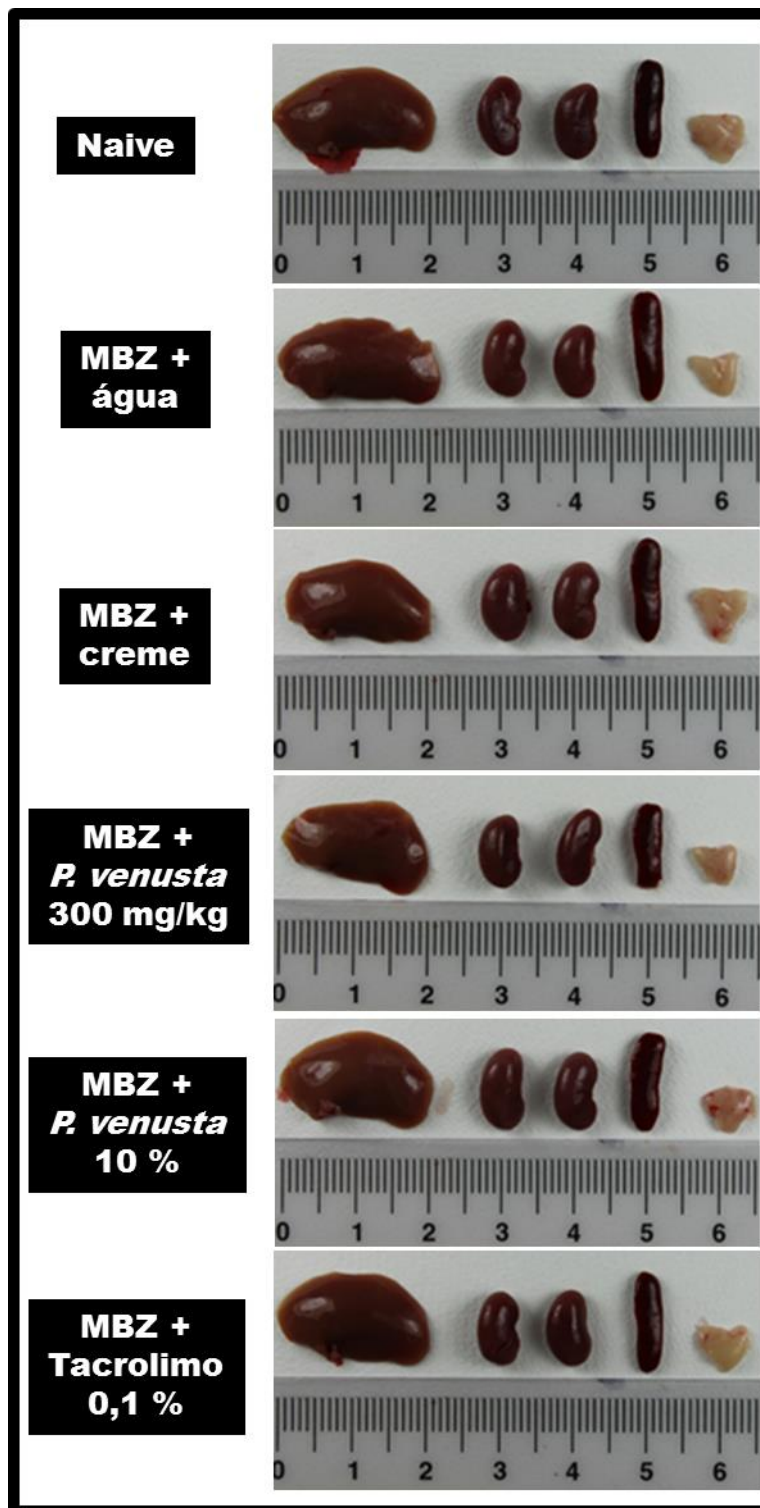


Figura 36. Avaliação da morfologia de órgãos dos animais no modelo de vitiligo induzido por monobenzone e tratado com *P. venusta*. Fotos representativas dos órgãos dos animais. Na sequência: fígado, rins, baço e timo.

Com o intuito de facilitar o entendimento e visualização dos resultados obtidos, tabelas com o resumo dos mesmos foram elaboradas.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos com o tratamento com do EHPV nos modelos induzidos por óleo de cróton. Símbolos: (---) parâmetro não avaliado; (X): sem alteração do parâmetro; (↓): redução do parâmetro avaliado.

<u>MODELO AGUDO INDUZIDO POR OC</u>			
<u>Parâmetro avaliado</u>	<i>Gel natrosol</i>	<i>Creme não-iônico</i>	<i>Via oral</i>
Espessura da orelha	↓	X	X
Atividade da MPO	X	X	↓
<u>MODELO MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE OC</u>			
<u>Parâmetro avaliado</u>	<i>Gel natrosol</i>	<i>Creme não-iônico</i>	<i>Via oral</i>
Espessura da orelha	X	↓	↓
Atividade da MPO	X	X	X
Atividade da NAG	X	X	↓
Infiltrado celular	---	↓	↓
IL-1β	---	X	↓
IL-6	---	X	↓
TNF-α	---	X	↓
EROs	---	↓	X

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos com o tratamento com EHPV no modelo de vitiligo induzido por monobenzona. Símbolos: (X) sem alteração do parâmetro; (↓): redução do parâmetro avaliado; (↑): aumento do parâmetro avaliado.

<u>MODELO DE VITILIGO INDUZIDO POR MONOBENZONA</u>		
<u>Parâmetro Avaliado</u>	<i>Creme não-iônico</i>	<i>Via oral</i>
Despigmentação dos pelos	↑	↑
Melanina epidermal	↑	↑
Despigmentação da derme	↓	↓
EROs	↑	↑
Infiltrado celular	↓	↓
IL-1β	X	X
IL-6	X	X
TNF-α	↓	↓
Marcação melanina	↑	X

7 DISCUSSÃO

Embora algumas propriedades da *P. venusta* tenham sido comprovadas, não há na literatura relatos sobre qualquer atividade biológica relacionada com produção de melanina ou vitiligo. Tendo como base o conhecimento etnofarmacológico, o presente trabalho buscou verificar a possível atividade hiperpigmentante do extrato HE das folhas de *P. venusta*. Tanto em modelo *in vitro* quanto em modelos *in vivo* os resultados foram satisfatórios e mostraram atividade farmacológica bastante significativa em parâmetros imunes/inflamatórios, oxidativos e envolvidos na melanogênese. Esses resultados permitiram, direta e indiretamente, evidenciar seu potencial para o tratamento do vitiligo. Assim, *P. venusta* é uma planta promissora para o desenvolvimento de um agente para essa doença negligenciada e que causa muitos transtornos para os pacientes.

Além de ser desfigurante, o vitiligo é normalmente assintomático, embora exista grande tendência para queimaduras, prurido e envelhecimento cutâneo (ALIKHAN *et al.*, 2011). Em algumas culturas, acredita-se que o vitiligo seja resultado de infecções transmitidas sexualmente ou consequência da lepra, podendo resultar em efeito negativo no que diz respeito a questões educacionais e sociais (TAIEB; PICARDO, 2007; LINTHORST HOMAN *et al.*, 2009; ALIKHAN *et al.*, 2011). As lesões de pacientes com vitiligo estão associadas com maior incidência de morbidades psiquiátricas (RORDAM *et al.*, 2012), redução da qualidade de vida e baixa autoestima. Essas morbidades psiquiátricas globais foram vistas em 79,2% dos pacientes; dentre elas a depressão maior (56,6%) e fobia social (67,9%). Assim, a qualidade de vida dos pacientes é inversamente relacionada com comorbidades relacionadas a transtornos mentais (RAMAKRISHNA; RAJNI, 2014).

Não existe cura para o vitiligo. Os tratamentos atuais têm o propósito de aumentar ou diminuir a pigmentação a fim de alcançar resultados esteticamente agradáveis e aumentar a autoestima dos pacientes (FELSTEN *et al.*, 2011). A repigmentação exige, normalmente, tempo de tratamento prolongado com pouco resultado positivo alcançado (RORDAM *et al.*, 2012). Os esteroides de uso tópico geram cerca de 50-75% de taxa de repigmentação (FELSTEN *et al.*, 2011). O tacrolimo e calcipotrieno são alternativas para os agentes repigmentantes tópicos (MOUZAKIS *et al.*, 2011). PUVA e NB-UVB

são eficazes (FELSTEN *et al.*, 2011; MOUZAKIS *et al.*, 2011); no entanto, o primeiro pode ser carcinogênico, além de ambos necessitarem de tempo prolongado de tratamento (BHATNAGAR *et al.*, 2007; MOUZAKIS *et al.*, 2011). Também existem outras opções como, por exemplo, o transplante de melanócitos. Independente do tipo de tratamento, a repigmentação continua sendo um efeito difícil e demorado, ainda mais em pacientes com vitiligo avançado (RORDAM *et al.*, 2012). Em muitos casos, nos quais as lesões acometem mais de 50% da superfície corporal, uma solução pode ser o uso de agentes despigmentantes (ALGHAMDI; KUMAR, 2011; FELSTEN *et al.*, 2011), com o intuito de despigmentar áreas onde ainda exista pigmentação. Vale ressaltar que é uma abordagem agressiva e deve-se levar em consideração a base individual devido a mudanças irreversíveis e aumento da sensibilidade a queimaduras solares em áreas tratadas (ALGHAMDI; KUMAR, 2011).

Considerando que os pacientes que precisam de tratamento para vitiligo são bastante prejudicados pela falta de terapias seguras e eficazes, inviabilizando em muitos casos o seu uso, necessita-se da busca constante por novas alternativas de tratamento que sejam satisfatoriamente eficazes e que causem poucos efeitos adversos (GARCIA-PEREZ *et al.*, 2012).

Assim, a investigação clínica da medicina tradicional tem aberto novas possibilidades terapêuticas, através da descoberta de novos compostos químicos ou através da validação de preparações tradicionais (GRAZ, 2013).

A pesquisa pré-clínica tem como função avaliar a ação de uma nova molécula em animais, após seu efeito identificado em experimentos *in vitro*. Essas informações preliminares são essenciais para avaliar sua atividade farmacológica. Somente após a sua comprovação, bem como seu perfil toxicológico aceitável, é que as substâncias avaliadas passarão para a próxima fase: a pesquisa clínica, definida como “qualquer investigação em seres humanos, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos de produto(s) e/ou identificar reações adversas ao produto(s) em investigação, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia.” (ANVISA).

Na tentativa de comprovar a atividade hiperpigmentante da *P. venusta*, experimentos com cultivo celular foram realizados, com o intuito de verificar a ação desse diretamente em melanócitos. Apesar da eficiência pobre devido à

baixa visão global da doença, com essa ferramenta pode-se ter uma noção se determinado composto é viável e se é capaz de produzir um efeito desejado. Podem ser utilizados melanócitos normais humanos, bem como linhagem de melanoma para a pesquisa inicial (DELL'ANNA *et al.*, 2012).

O extrato HE das folhas de *P. venusta* aumentou a produção de melanina em células da linhagem B16F10, em concentrações incapazes de alterar a viabilidade celular, sugerindo que possa ter habilidade de interferir diretamente com o melanócito.

A síntese de melanina é fundamentalmente regulada pela tirosinase, a enzima passo-limitante. Ela é produzida somente em melanócitos e após seu processamento no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, é transferida em melanosomos, onde a melanina é sintetizada e armazenada (ANDO *et al.*, 2007). A atividade da tirosinase *in vitro* é um ensaio que visa avaliar a atividade da enzima somente com a presença do extrato. O extrato HE da *P. venusta* não mostrou aumento dessa atividade.

Outros mecanismos podem explicar o aumento da melanina produzida pela *P. venusta*, como aumento da maturação ou aumento da estabilidade da tirosinase, ambos capazes de aumentar a síntese e deposição de melanina; além da modulação da transcrição e pós-transcrição do RNAm. Além disso, a degradação da tirosinase e sua estabilidade são relevantes para o controle da biossíntese de melanina (ANDO *et al.*, 2007).

Como a pigmentação pode ser resultado da proliferação, migração (LAN *et al.*, 2005) ou aumento na dendricidade de melanócitos (SCOTT *et al.*, 2006), sugere-se que a *P. venusta* possa atuar em alguns desses parâmetros, regulando vias de sinalização complexas *in vitro*, podendo, dessa forma, causar repigmentação na pele vitiliginosa.

A avaliação de compostos *in vitro* é uma ferramenta útil para direcionar a pesquisa, considerando efeitos tanto relacionados com eficácia de um determinado produto, como sua segurança aparente. Os efeitos encontrados em cultivo celular não são com frequência os mesmos encontrados em um organismo intacto (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012). Dessa forma, modelos animais são necessários para que se tenha uma ideia mais ampla dos efeitos produzidos. Além disso, antes que se iniciem triagens com humanos,

estudos que provem o efeito do composto são necessários em modelos animais relevantes (TAIEB, 2012).

Dados histológicos encontrados ao longo das últimas três décadas têm mostrado boa evidência que, na borda externa das máculas brancas em pacientes com vitiligo, um infiltrado inflamatório de baixa intensidade composto por células mononucleares ocorre na derme superior e na interface derme-epiderme (TAIEB, 2012).

O início da reação microinflamatória ainda é um mistério, mas estudos experimentais recentes sugerem que vários gatilhos locais alertam o sistema imune inato e pode preceder as respostas imunes adaptativas que possuem como alvo os melanócitos (KROLL *et al.*, 2005; VAN DEN BOORN *et al.*, 2011). Em contraste com outras condições crônicas patológicas da pele, as quais possuem características clínicas evidentemente inflamatórias, como dermatite atópica e psoríase, no vitiligo, novos ângulos de ataque ainda podem vir de uma parte importante que falta do conhecimento fisiopatológico. Por isso, cada vez mais estudos e novas publicações exploram aspectos relacionados com componentes imune-inflamatórios do vitiligo, e podem ajudar, no futuro, a tratar mais eficientemente esses pacientes negligenciados terapêuticamente (VAN GEEL *et al.*, 2012; MOSENSON *et al.*, 2013).

A terapia da fase imune-inflamatória do vitiligo é, atualmente, inespecífica e utiliza imunossupressores de amplo espectro (corticoides e inibidores de calcineurina, na sua maioria aplicados localmente ou associados à fototerapia). Novos conhecimentos a respeito dos mecanismos regulatórios para a tolerância a auto-antígenos sugerem que uma subpopulação fisiológica de células T, chamadas de células T regulatórias (Treg), podem não ser capazes de suprimir a atividade de células T citotóxicas, contribuindo para a perda progressiva de melanócitos. Esse mecanismo não é exclusivo para o vitiligo, uma vez que a disfunção em Treg foi recentemente associada com outras doenças autoimunes e alérgicas (TAIEB, 2012).

Muitas substâncias são testadas em ensaios pré-clínicos através de modelos animais que mimetizam as condições inflamatórias da pele observadas na clínica. Entre esses modelos, o edema de orelha induzido por OC é amplamente utilizado, por permitir de maneira prática e rápida a

identificação de agentes anti-inflamatórios, sendo considerados para o tratamento de doenças cutâneas (STANLEY *et al.*, 1991).

Nesse trabalho, a atividade anti-inflamatória do EHVB foi avaliada através no modelo agudo após sua incorporação em três diferentes veículos: pomada, gel e creme não-iônico, com o intuito de verificar se havia alteração direta do veículo na ação anti-inflamatória, bem como de comparar com qual veículo o extrato promoveria uma melhor ação. É importante salientar que o tipo de liberação do veículo de uma formulação pode afetar marcadamente as propriedades de penetração e absorção do agente ativo, afetando, conseqüentemente, sua potência e eficácia, bem como seus efeitos adversos (FINI *et al.*, 2008). A pomada por si só resultou na alteração da espessura da orelha dos animais. Nas preparações do EHPV com creme e gel, apesar desses terem mostrado resultados diferentes, não houve alteração provocada pela ação do veículo.

Uma vez que o vitiligo é uma doença inflamatória crônica, as preparações foram avaliadas no modelo de inflamação por múltiplas aplicações de OC. A *P. venusta* causou redução de alguns parâmetros inflamatórios, como a espessura da orelha, atividade de enzimas relacionadas com a infiltração de células polimorfonucleares e mononucleares para o local inflamado; comprovada pela diminuição de células marcadas na avaliação histológica. Esses resultados foram observados tanto na preparação do EHPV no creme não-iônico como na preparação por via oral. Essa última foi testada visto que, normalmente, o tratamento de doenças inflamatórias da pele necessita da combinação de agentes sistêmicos e tópicos (FINI *et al.*, 2008).

Além das respostas mostradas anteriormente, o modelo de OC induz o aumento de níveis de citocinas pró-inflamatórias e esse aumento não foi observado nos grupos tratados com *P. venusta* 300 mg/kg.

As citocinas são pequenos peptídeos de sinalização, similares a hormônios, produzidos por células ativadas por mediadores inflamatórios. Mais de 100 citocinas já foram descritas com diferentes funções e locais de origem. Na pele, as citocinas são produzidas por células residentes (queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos, mastócitos e macrófagos) e pelas células recrutadas dos infiltrados celulares (neutrófilos, eosinófilos e linfócitos). De uma forma geral, as citocinas não são armazenadas, mas sim secretadas após

ativação celular. Elas incluem: linfocinas, monocinas, interleucinas, interferons, fatores de crescimento e quimiocinas. Elas possuem ação autócrina ou parácrina, controlando todas as fases da resposta imune. Seu papel principal é regular o tráfego de leucócitos e manter suas funções no sistema imune. A ativação excessiva com a síntese de citocinas são a marca de muitas doenças autoimunes e inflamatórias (NEDOSZYTKO *et al.*, 2014).

A compreensão das citocinas em pacientes com vitiligo ainda é limitada e inconsistente (BASAK *et al.*, 2009). Elas podem exercer duas funções principais no vitiligo: no papel de mediadores inflamatórios, desempenhando importantes papéis em doenças autoimunes (FELDMANN *et al.*, 1998; MORETTI *et al.*, 2002); no papel essencial na patogênese, estando envolvidas na despigmentação (ESMAEILI *et al.*, 2011). As principais citocinas relacionadas com a patogênese do vitiligo e que foram direta ou indiretamente estudadas nesse trabalho são: IL-17, IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α .

A IL-1 e TNF são citocinas inflamatórias primárias, uma vez que são produzidas durante respostas celulares iniciais a estímulos inflamatórios, as quais ativam as células em direção à produção de citocinas inflamatórias secundárias, como é o caso da IL-6 e IL-17 (NEDOSZYTKO *et al.*, 2014).

Perfil de citocinas Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-8) tem sido descrito nas lesões da pele de pacientes tanto no VS quanto VNS (MORETTI *et al.*, 2002; WANKOWICZ-KALINSKA *et al.*, 2003; BIROL *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2012; TOOSI *et al.*, 2012). Além da resposta Th1, também há a influência de resposta mediada por Th17, isto é, infiltração de linfócitos IL17+ nas áreas da derme na borda das lesões; além de aumento da expressão de IL-17A e IL-1 β também na borda das lesões (WANG *et al.*, 2011); e aumento de IL-17 no soro de pacientes (KHAN *et al.*, 2012; TARLE *et al.*, 2014).

A IL-17 é classificada como um mediador pró-inflamatório devido à sua habilidade em induzir uma série de efetores inflamatórios nas células-alvo (GAFFEN, 2004), mediando a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos para os locais de inflamação através da IL-8 (WITOWSKI *et al.*, 2000). Esmaeili e cols. (2011) observaram altos níveis de expressão de IL-17 nos neutrófilos de pacientes com vitiligo (ESMAEILI *et al.*, 2011). Apesar de nenhum estudo apresentar com clareza o papel dos neutrófilos no vitiligo, se houver a diminuição de neutrófilos para o local lesionado, provavelmente haverá redução

de IL-17 no local. Esse fato acaba gerando um ciclo, no qual a redução de qualquer um desses componentes irá gerar a diminuição de outros. A preparação oral foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO no modelo agudo. Além disso, tanto a preparação do EHPV no creme, quanto por via oral, foram capazes de reduzir o número de células infiltradas no modelo por múltiplas aplicações de OC, apesar de não terem atuado diretamente na enzima MPO nesse modelo.

IL-1 β é uma citocina conhecida por sua habilidade em causar uma vasta opção de efeitos biológicos associados com infecção, inflamação e autoimunidade, regulando respostas sistêmicas e locais. A regulação se dá através da geração de febre, ativação de linfócitos e promoção da transmigração de leucócitos para o local da injúria (SIMS; SMITH, 2010). Ela pode atuar através dos mecanismos: i) indução da upregulação da expressão do receptor de IL-2 na superfície dos linfócitos; ii) sobrevivência de células T; iii) instrução das células B para aumentar a produção de anticorpos e iv) promover a proliferação de células B (MALISZEWSKI *et al.*, 1990; BEN-SASSON *et al.*, 2009; DINARELLO, 2009; SIMS; SMITH, 2010). Uma característica que merece destaque é que a sinalização via IL-1 β mostrou promover diferenciação em células Th17 (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; CHUNG *et al.*, 2009; SUTTON *et al.*, 2009; LAMKANFI *et al.*, 2011). O fato de a *P. venusta* oral diminuir os níveis de IL-1 β pode ser explicado pela redução do número de células infiltradas, com conseqüente parada de respostas dependentes do sistema imune. Independente da razão de sua diminuição pode levar a respostas sistêmicas, diminuindo ativação de linfócitos e transmigração de leucócitos citados acima. Dessa forma, esse resultado encontrado no trabalho mostra uma das principais ações da *P. venusta* no controle da regulação do sistema imune, permitindo que o extrato atue em respostas locais e sistêmicas, diminuindo a transmigração de leucócitos e atuando na produção de anticorpos e linfócitos.

Em outros estudos foi mostrado que níveis de IL-6 estão aumentados no soro e na pele lesionada de pacientes com vitiligo (SINGH *et al.*, 2012). A IL-6 é uma citocina produzida em resposta a alguns estímulos por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, células endoteliais, células da glia e queratinócitos.

Dentre os estímulos, merece destaque o estímulo mediado por IL-1 e TNF (HIRANO, 1998). Sua modulação na diferenciação de células TCD4⁺ em efetores Th1 ou Th2, mostra a relevância da IL-6 em diferentes aspectos da resposta imune (DIEHL; RINCON, 2002). Além disso, ela inibe o crescimento e modula a expressão de antígenos de melanócitos (WANG *et al.*, 2014). O OC é capaz de aumentar os níveis de IL-6 em animais. O tratamento com *P. venusta* 300 mg/kg diminuiu esses níveis a valores similares àqueles encontrados em animais que não foram submetidos a nenhuma indução/tratamento. Isso pode ser pela diminuição de níveis de IL-1 e TNF, os quais são capazes de estimular a produção de IL-6. Ou talvez pela redução tanto de células linfoides quanto de células não linfoides no local. O importante, mais uma vez, é que o tratamento conseguiu diminuir um parâmetro essencial para a regulação da resposta imune.

TNF- α é produzido por múltiplas células epiteliais, incluindo queratinócitos, células de Langerhans e mastócitos (LADUCA; GASPARI, 2001). Sua ligação a seus receptores leva à ativação de NF- κ B, promovendo inflamação e/ou apoptose celular. Está envolvido no recrutamento de células imunes para o microambiente da pele (SPRINGER, 1990). Também induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e IL-8 (SEHGAL *et al.*, 2014). Essa citocina epidermal pode ser secretada em resposta ao processo inflamatório induzido por compostos químicos e radiação UV. TNF- α é capaz de induzir a expressão de RNAm de IL-8 em linhagem de melanoma (MOHLER *et al.*, 1996), bem como *upregular* a expressão de receptor de IL-8 em melanócitos normais (NORGAUER *et al.*, 2003)

IL-8 (CXCL8) é uma quimiocina importante em doenças inflamatórias da pele, produzida por monócitos, mastócitos, fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas e queratinócitos. Sua ação quimiotática permite a infiltração de neutrófilos e linfócitos T (LUGER; SCHWARZ, 1990). Está relacionada com a indução do estresse oxidativo, levando, indiretamente, à apoptose de melanócitos e queratinócitos no vitiligo (SCHALLREUTER; BAHADORAN; *et al.*, 2008).

Em estágios iniciais da doença, quando os melanócitos ainda estão presentes na epiderme, essas três citocinas, avaliadas no estudo, podem ser liberadas por vários tipos celulares, estimulando a expressão de IL-8 pelos

melanócitos, levando à apoptose de melanócitos e queratinócitos. As células apoptóticas, por sua vez, liberariam altas quantidades de IL-1 e TNF, aumentando a inflamação da pele (LUGER; SCHWARZ, 1990; MINIATI *et al.*, 2014). TNF- α pré-formado e recém-sintetizado pode ser liberado, também, por mastócitos, os quais estão aumentados no centro das lesões de pacientes com vitiligo (ARONI *et al.*, 2010).

A inflamação crônica se manifesta em superprodução de citocinas pró-inflamatórias e através da geração de mediadores inflamatórios, como PGE₂, NO, IFN- γ e EROs. Esses mediadores são potentes ativadores dos componentes da cascata de transdução de sinais pró-inflamatórios, incluindo PKC, cuja ativação também é produzida pelo OC.

No modelo de OC, houve aumento significativo de EROs. O tratamento com *P. venusta* 10% foi capaz de reduzir esses valores ou impedir que houvesse sua produção. A redução de níveis de EROs pode ser explicada indiretamente através da redução de infiltrado celular para o local, e, diretamente através da ação antioxidante do extrato.

Níveis baixos de sistemas antioxidantes como catalase ou vitamina A, C e E foram demonstrados na epiderme lesionada e não-lesionada de pacientes com vitiligo (SCHALLREUTER *et al.*, 1999). Esse aumento da produção intracelular de EROs, levando à interação com macromoléculas como proteínas, lipídeos de membrana e ácido nucléico através do desbalanço mitocondrial foi observada em pacientes com a doença (DELL'ANNA *et al.*, 2001; ESKANDANI *et al.*, 2010). Considerando que a *P. venusta* diminui níveis de EROs, pode-se inferir que tenha potencial para ser usada como antioxidante no tratamento do vitiligo.

Uma vez que altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e EROs contribuem para os mecanismos patofisiológicos de várias doenças inflamatórias da pele (NUMEROF *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2011); uma substância capaz, dentre outras ações, de reduzir esses desencadeadores ou mantenedores da patogênese, parece ser bastante promissora.

Assim, além dos efeitos de regulação dos componentes inflamatórios/imunes propriamente ditos, a ação da *P. venusta* no modelo de OC pode nos fornecer outras evidências. Sabe-se que há associação entre condições inflamatórias da pele e pigmentação (FELLER *et al.*, 2014). As

citocinas pró-inflamatórias, além de causarem aumento da microinflamação no local, também causam inibição da pigmentação (MORETTI *et al.*, 2009). O óleo de cróton exerce suas ações inflamatórias através da via de transdução de sinais dependente de PKC, a qual também está envolvida na regulação da melanogênese (LEE; NOH, 2013).

Estudos *in vitro* mostraram que o TPA (principal componente do OC) diminui a síntese de melanina em células de melanoma murino via inibição da transcrição de RNAm da tirosinase (FULLER *et al.*, 1990; KUZUMAKI *et al.*, 1993; ANDO *et al.*, 1995). Ativa fosfolipase D₂ e sua *over*-expressão diminui níveis de tirosinase nas células de melanoma *in vitro*. Resumindo, a *downregulation* da síntese de melanina é causada pela diminuição de níveis de tirosinase mediada pela degradação proteasomal induzida por fosfolipase D₂ (KAGEYAMA *et al.*, 2004; ANDO *et al.*, 2007). Assim, alteração da resposta no modelo de OC pode sugerir alguma interação da *P. venusta* com as vias de sinalização intracelulares relacionadas com inflamação e melanogênese.

Tanto as citocinas, quanto mediadores inflamatórios modulam a ativação e homeostase de linfócitos (MCCULLY *et al.*, 2012); assim, são importantes focos da pesquisa devido à sua relação com a hipótese autoimune.

Inicialmente, a utilização do modelo de parâmetros inflamatórios induzidos pela aplicação múltipla de OC foi interessante, fornecendo evidências de que a *P. venusta* é capaz de diminuir o microambiente inflamatório no local da indução, diminuição da infiltração tanto de neutrófilos quanto de monócitos, diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de EROs. Apesar de saber que o vitiligo está relacionado com a resposta inflamatória, esse modelo apenas nos fornece uma parte das respostas necessárias para o embasamento de evidências da *P. venusta* no vitiligo. Além disso, sabe-se que o TPA regula a proliferação de melanócitos, síntese de melanina, aumenta a dendricidade (HIROBE *et al.*, 2004; IMOKAWA, 2004) e também atua no crescimento de melanócitos através da ativação de PKC (ARITA *et al.*, 1992), podendo mascarar novos resultados.

Dessa forma, o modelo de vitiligo serviu para dar continuidade aos ensaios realizados com animais, direcionando a pesquisa para o envolvimento do estresse oxidativo e do sistema imune em um organismo produtor de

melanina. A convergência dos dois modelos permite um entendimento mais global da ação da *P. venusta*.

A monobenzona foi aprovada pelo FDA, desde 1952, como agente de despigmentação permanente no vitiligo extenso (RORDAM *et al.*, 2012). É usada em casos severos em concentrações de 20 e 40% para produzir despigmentação permanente (ALGHAMDI; KUMAR, 2011; FELSTEN *et al.*, 2011), devido à indução de morte dos melanócitos (ALGHAMDI; KUMAR, 2011). Foi a partir desse efeito que Zhu e cols. (2013) desenvolveram o modelo animal de vitiligo induzido por múltiplas aplicações de monobenzona (ZHU *et al.*, 2013).

Nesse modelo, a aplicação de monobenzona por via tópica em camundongos induz despigmentação da pele e pelos em locais expostos e não expostos; entretanto, a extensão das lesões depende da concentração da droga. Como resultado da ação da monobenzona, há a perda de melanócitos epidermais nas áreas despigmentadas. Nesse estudo, a despigmentação provocada pela aplicação de monobenzona (40%) foi vista tanto no local de aplicação quanto em outras regiões dos animais, sugerindo que houve ação sistêmica do agente indutor para todos os animais avaliados. O mesmo não foi observado nos grupos tratados com *P. venusta* (via tópica e via oral). Isso sugere que o extrato foi capaz de agir em algum mecanismo envolvido na regulação da morte de melanócitos e/ou na regulação da produção de melanina pelo mesmo. Os níveis de melanina na epiderme dos animais foram significativamente aumentados nos animais tratados tanto com *P. venusta* (através das duas vias) quanto com a droga de referência, o tacrolimo.

O mecanismo através do qual agentes despigmentantes atuam ainda é pouco compreendido. A despigmentação permanente da pele causada pela monobenzona, observada na maioria dos pacientes, sugere que essa droga é capaz de eliminar seletivamente melanócitos da epiderme. Dados recentes mostraram que a monobenzona atua somente em melanócitos e não sob queratinócitos, suportando sua seletividade (HARIHARAN *et al.*, 2010). Esse efeito seletivo em melanócitos pode ser explicado pela homologia estrutural com a tirosina, o substrato natural para a melanogênese. Quando combinado com a tirosinase, a monobenzona é convertida em uma quinona altamente

reativa, sugerindo reagir com compostos enzimáticos vizinhos, dentro dos limites da organela melanosomal (WESTERHOF, 2007).

As quinonas se ligam a compostos melanosomais através de um processo conhecido como haptênização, através do qual o composto de origem sofre leves alterações estruturais (MANINI *et al.*, 2009). Modificações em enzimas melanosomais são significantes, visto que TRP-2, proteína de matriz melanosomal (gp100) e tirosinase por si só são moléculas imunogênicas e mudanças menores ocorrem na composição de aminoácidos ou mesmo a haptênização pode alterar o reconhecimento pelas células T reativas com peptídeos nativos (DOUAT-CASASSUS *et al.*, 2006). Por causa do aumento da afinidade por peptídeos modificados, a tolerância imune pode ser quebrada e o aumento da reatividade pode, provavelmente, ocorrer. Esse processo é significativo para o conhecimento do processo de despigmentação no vitiligo (HARIHARAN *et al.*, 2011).

Características histopatológicas do vitiligo variam conforme o tempo da lesão. No início da doença ocorre hipomelanose basal e inflamação linfocítica esparsa à média na derme papilar em contraste com a pele perilesional. Análises histopatológicas da pele de pacientes com vitiligo indicam, dentre outras características, ausência de pigmento e vacuolização suprabasal, mudanças inflamatórias em lesões de curta duração e infiltrado inflamatório perivascular, adelgamento da epiderme, degeneração de glândulas sudoríparas e degeneração de nervos dermais. No entanto, as principais características encontradas no vitiligo e que servem como diagnóstico são a perda da pigmentação e a presença de células inflamatórias na derme (PATEL *et al.*, 2013).

A similaridade entre vitiligo humano ativo e a despigmentação induzida por monobenzona, no que diz respeito a suas características histológicas e patogênese, sugere que esse modelo animal possui grande potencial para a pesquisa do vitiligo (ZHU *et al.*, 2013).

No modelo de vitiligo utilizado nesse trabalho, a monobenzona causou aumento de infiltrado celular na derme (mostrado através da análise histológica por HE), mimetizando a infiltração de células inflamatórias na derme acima citada, e perda da pigmentação tanto na região epidermal quanto nos folículos pilosos (análise histológica por Fontana-Masson). O tratamento com *P. venusta*

mostrou redução do número de células infiltradas para a derme/epiderme, bem como o aumento bastante considerável da presença de melanina no interior de folículos pilosos dos animais.

O folículo piloso humano é um apêndice da pele e consiste de um segmento superior morfológicamente permanente e um segmento inferior que se remodela durante o ciclo, no qual três fases são descritas: (a) anágena, onde a fase de crescimento ocorre gerando o pelo propriamente dito, a bainha interna da raiz, bainha externa da raiz e matriz; (b) catágena, com regressão do epitélio pós-apoptose e (c) telógena, com as células em repouso (PAUS; COTSARELIS, 1999; COTSARELIS, 2006). Na região bulbar, múltiplos melanócitos, dendríticos, tirosinase-positivos, diferenciados e localizados dentro da matriz produzem melanina. Todas essas estruturas anatômicas constituem a unidade de folículo piloso, o qual possui um reservatório de melanócitos (FALABELLA, 2009).

As células indiferenciadas são mantidas em um nicho, localizado na parte inferior da protuberância, logo abaixo das células indiferenciadas do folículo piloso. A região do bulbo do folículo piloso, definida como a porção da bainha externa da raiz, no local de inserção do músculo pilo-erector, constitui o melhor local com populações de células indiferenciadas epidermais (FALABELLA, 2009).

No vitiligo, existem duas abordagens que devem ser consideradas: a repigmentação e a parada/impedimento da morte de melanócitos. A repigmentação depende de melanócitos disponíveis de três possíveis fontes: unidade do folículo (principal provedor de células pigmentantes), da borda das lesões vitiliginosas e dos melanócitos não afetados dentro das áreas despigmentadas (FALABELLA, 2009).

A pigmentação dos pelos/cabelos é fornecida por melanócitos foliculares ativos localizados acima da papila dermal (BERNARD, 2005). A síntese e transferência de grânulos de melanina são reguladas por um grupo de enzimas, proteínas estruturais e regulatórias, transportadores, receptores e seus ligantes, atuando em todos os estágios e células no desenvolvimento do folículo capilar. Durante cada ciclo capilar, no momento da transição da fase anágena para catágena, os melanócitos na matriz do bulbo sofrem apoptose e sua reconstituição começa justamente a partir do momento que se inicia a

próxima fase anágena, uma sequência que somente é possível por causa das células indiferenciadas no bulbo que ativam e induzem a proliferação de melanócitos e sua migração. Esse ciclo se repete uma vez ou outra produzindo melanina para a pigmentação do cabelo (NISHIMURA *et al.*, 2002).

Como visto por Fontana-Masson, *P. venusta* por via tópica causou aumento da marcação de melanina no interior dos folículos pilosos. Isso quer dizer que pode ter diminuído a morte de melanócitos no interior, somente ter mantido a fase anágena, impedindo que a apoptose ocorresse na fase seguinte ou aumentado o tempo na fase anágena. Assim, aumenta a fonte capaz de repigmentar o tecido.

Para que a repigmentação ocorra, é necessário que os melanócitos sejam estimulados com sinais apropriados. Para isso, duas propriedades dos melanócitos precisam ser levadas em consideração: (a) neo-melanogênese, a qual implica na síntese de melanina e produção de melanosomos e (b) migração de melanócito, o qual pode ajudar as células pigmentadas a alcançarem a pele despigmentada (FALABELLA, 2009). De uma forma ampla, a *P. venusta* tanto por via tópica, quanto por via oral foi capaz de manter a melanina epidermal. Não foi avaliado se houve aumento da produção de melanina ou se não houve perda de melanócitos epidermais, além do aumento da sua atividade. O importante é que os níveis epidermais foram similares ao grupo dos animais que não passaram por qualquer tratamento. Considerando que o extrato causou aumento da produção de melanina *in vitro*, pode-se inferir que, nos animais, esse fato também possa ter ocorrido.

Nos animais, as enzimas TRP-1, TRP-2 e tirosinase possuem funções diversas e complementares na fase anágena, como diferenciação e proliferação dos melanócitos, bem como da produção direta de melanina (BOTCHKAREVA *et al.*, 2003). O tratamento com *P. venusta* mostrou um aumento significativo da marcação de melanina no interior dos folículos pilosos dos animais C57BL/6. Assim, pode-se sugerir que o extrato pode estar atuando no aumento das enzimas tirosinase, TRP-1 e TRP-2, as quais causarão a diferenciação e/ou proliferação de melanócitos, ou a produção de melanina pelos melanócitos dos folículos pilosos. Outro ponto de vista a ser analisado é que, caso não tenha havido o aumento da pigmentação nesses animais, o

tratamento conseguiu impedir a morte dos melanócitos induzida por monobenzona, ou conseguiu manter os folículos pilosos na fase anágena.

Outro fator a ser considerado é que, em muitos casos, há a necessidade de impedir que ocorra a exaustão da reserva de melanócitos, a qual levaria à leucotriquia em pacientes com vitiligo. Quando isso ocorre, as terapias existentes são muito improváveis e somente o transplante seria a melhor terapia para a pele despigmentada (FALABELLA, 2009). Seguindo esse raciocínio, a *P. venusta* manteve os níveis de melanina similares àqueles encontrados em animais que não foram submetidos a qualquer tipo de indução/tratamento. Isso significa que, ao longo do período experimental, o extrato impediu o dano causado pela monobenzona, reverteu a indução dos parâmetros ou ambos.

A região do bulbo é um local com relativo privilégio imune, protegendo o reservatório de células indiferenciadas do folículo epitelial de ataques imunes auto-agressivos (MEYER *et al.*, 2008). Isso explicaria a presença de cabelos pigmentados (pelos) nas lesões vitiliginosas. Além disso, existem evidências que demonstram a presença de outras células indiferenciadas localizadas na epiderme interfolicular, ou seja, na porção da epiderme localizada entre os orifícios dos folículos pilosos (ABBAS; MAHALINGAM, 2009). Como o tratamento com *P. venusta* mostrou aumento da pigmentação nos folículos pilosos, pode-se sugerir que o ataque de células imune tenha sido menor.

Considerando estudos mostrados anteriormente, nos quais foram apresentados os papéis de citocinas pró-inflamatórias na pele, entre eles seu papel na regulação da resposta imune, a diminuição de níveis de TNF- α no modelo do vitiligo poderia justificar essa proteção das células indiferenciadas localizadas no bulbo.

O vitiligo, quando induzido quimicamente, leva ao aumento da produção de IL-6 e IL-8 (TOOSI *et al.*, 2012). Infelizmente, no modelo da monobenzona utilizado nesse trabalho, não houve alteração dos níveis de IL-6, apenas de TNF- α . Essa citocina inibe a síntese de melanina em linhagem de melanoma murino e em melanócitos normais humanos (SWOPE *et al.*, 1989; SWOPE *et al.*, 1991). Outro estudo sugere que o TNF- α diminui a estabilidade da tirosinase e TRP-1, bem como os seus RNAm correspondentes (MARTINEZ-ESPARZA *et al.*, 1998; ANDO *et al.*, 2007). Vários estudos têm demonstrado

que TNF- α é expresso em níveis diferentes tanto na pele quanto no soro de pacientes com vitiligo, quando comparados a pacientes saudáveis (GREGG *et al.*, 2010; HARRIS *et al.*, 2012).

Os queratinócitos contribuem para a homeostase dos melanócitos e alterações causadas nos primeiros podem ter papel crucial na disfunção dos melanócitos encontrados no vitiligo. Sabe-se que há o aumento da expressão de RNAm de TNF- α na epiderme de biópsias de pacientes. O aumento de TNF- α pode contribuir para a apoptose de queratinócitos, resultando na liberação de citocinas melanogênicas e, conseqüentemente, no desaparecimento de melanócitos (MORETTI *et al.*, 2009).

Além disso, mediadores biológicos presentes nos melanossomos transferidos para queratinócitos, faz com que os melanócitos influenciem as atividades funcionais dos queratinócitos (PLONKA *et al.*, 2009) e os queratinócitos regulam a melanogênese através de mediadores biológicos (ação parácrina) que os mesmos secretam (PLONKA *et al.*, 2009) como hormônio melanócito-estimulante (MSH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), β -endorfina, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), endotelinas e SCF (HIROBE, 2005). Assim, se os níveis de TNF- α forem reduzidos, provavelmente a apoptose de queratinócitos seria igualmente reduzida, impedindo que ocorresse a regulação negativa de síntese de melanina. Dessa forma, a diminuição dos níveis de TNF- α após o tratamento com as diferentes preparações de *P. venusta* realça seu papel potencial no vitiligo.

O vitiligo é considerado uma doença degenerativa, causada, possivelmente, por um estresse contínuo que levaria à apoptose ou senescência de melanócitos (BELLEI *et al.*, 2013). Como algumas citocinas estão relacionadas com a proliferação e/ou diferenciação de melanócitos (HIROBE, 2005), de forma direta ou indireta, muito provavelmente as respostas imunes são desencadeadas pelo mesmo espectro de citocinas (WANG *et al.*, 2014). Resumindo, as mudanças na rede de citocinas e reações imunes podem iniciar apoptose; portanto são bastante relevantes para a perda de melanócitos no vitiligo (HUANG *et al.*, 2002; GLASSMAN, 2011). Um composto capaz de atuar, direta ou indiretamente nessa rede de citocinas merece atenção especial.

Como discutido anteriormente, não somente a autoimunidade está relacionada com o início e progressão da doença, mas também o estresse oxidativo, o qual capaz de atuar independente ou de forma sinérgica com componentes do sistema imune. Assim, são fatores-chave na patogênese do vitiligo.

O avanço nos estudos tem mostrado que tanto a destruição dos melanócitos mediada pela auto-imunidade quanto anormalidades intrínsecas de melanócitos parecem ser a razão do vitiligo. Evidências sugerem que ambos são ligados através de mecanismos do sistema imune inato. Vários padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) têm sido associados com o estresse celular e atuam como ligantes de receptores de reconhecimento de padrão inato (PRRs). É provável que no vitiligo, melanócitos estressados ativam o sistema de imunidade inata através da geração e liberação de DAMPs, os quais promovem o início da sinalização de perigo. A inflamação que se segue em última instância, leva à ativação do sistema da imunidade adaptativa, desse modo facilitando a destruição autoimune e a progressão do vitiligo (RICHMOND *et al.*, 2013).

Um grande número de fatores estressantes podem provocar repostas automimunes aos melanócitos. Fatores precipitantes no vitiligo incluem superexposição à radiação UV e contato com fenóis clareadores (BOISSY; MANGA, 2004; NAMAZI, 2007). O estresse emocional também é citado como fator precipitante pelos pacientes. Injúrias mecânicas após cortes ou queimadura podem induzir novas lesões e 50% dos pacientes observam o fenômeno de Köebner em pequenos locais da pele (DENMAN *et al.*, 2008).

A pele atua também como uma rede imune e, através da modificação da pigmentação constitutiva padrão, promove um sistema de defesa único contra agentes nocivos (COSTIN; HEARING, 2007). É importante ressaltar que a função de melanócitos como sensor de estresse possui a capacidade tanto de reagir a quanto de produzir uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento do microambiente, modulando respostas bactericidas, imunes e inflamatórias. Além disso, também possuem a capacidade de sequestrar íons metálicos e se ligar a certas drogas e moléculas orgânicas (TOLLESON, 2005; PLONKA; GRABACKA, 2006).

A geração de H_2O_2 é um evento fisiológico na resposta celular e desempenha papel crucial na sobrevivência e integridade celulares. Os melanócitos são especialmente sensíveis a EROs devido ao baixo nível de catalase nessas células. Concentrações na faixa de mM podem ser deletérias a muitas proteínas e peptídeos levando à desativação/ruptura de muitas vias importantes relacionadas à melanogênese (SCHALLREUTER; KOTHARI; *et al.*, 2008). Sob certas condições, mecanismos antioxidantes podem ser rompidos pelo H_2O_2 , incluindo catalase, tiredoxina redutase e metionina sulfóxido redutases A e B.

A tirosinase por si só é sensível a EROs devido à presença de 17 cisteínas nas regiões C- e N-terminal, levando a mudanças estruturais da enzima. Além de alterações estruturais, altas concentrações de H_2O_2 pode desativar a enzima através da oxidação do resíduo de metionina no sítio ativo (SCHWEIKARDT *et al.*, 2007).

No entanto, é importante ressaltar que tirosinase e outras proteínas são *up*-reguladas e ativadas por baixas concentrações de H_2O_2 (μM) (WOOD *et al.*, 2004). Nessas concentrações, também é capaz de *up*regular vários fatores de transcrição como p53, MITF, fator nuclear kappa B (NF- κ B) e enzimas antioxidantes como catalase, tiredoxina redutase, glutathiona redutase e metionina sulfóxido redutase A e B. A regulação e proteção da tirosinase do *burst* oxidativo também é fornecido por TRP-1 e TRP-2, as quais estão próximas da tirosinase na membrana melanossomal. No entanto, há homologia na sequência, especialmente nos domínios ricos em cisteína, os quais também são alvos da oxidação mediada por H_2O_2 (SCHALLREUTER; KOTHARI; *et al.*, 2008).

No modelo de OC, o tratamento com *P. venusta* conseguiu reduzir níveis de EROs, indicando que possui potencial antioxidante. No modelo do vitiligo, com animais C57BL/6, houve aumento significativo dessas espécies reativas.

Uma vez que a síntese de melanina é um processo dependente de oxigênio, paradoxalmente, também gera EROs, as quais podem acumular nos melanócitos. Dessa forma, a melanina possui ambas propriedades, antioxidante e citotóxica. Os intermediários quinonas e semi-quinonas formados durante a melanogênese são tóxicos (SLOMINSKI *et al.*, 2009; FELLER *et al.*, 2014).

Isso corrobora resultados anteriores, os quais mostraram aumento da melanina epidermal e pigmentação da derme dos animais. Os níveis de EROs foram similares aos níveis dos animais que não sofreram qualquer tipo de tratamento (naive). Dessa forma, pode-se concluir que esse aumento é característica normal dos animais, e que a monobenzona diminuiu esses níveis, muito provavelmente porque há menos melanina nos locais analisados.

Além disso, a exposição dos melanócitos à monobenzona pode ativar resposta de proteínas mal enoveladas (UPR) e aumentar a resposta antioxidante, mas também aumentar a expressão das citocinas IL-6 e IL-8, as quais contribuem para a progressão do vitiligo mediada pela autoimunidade (TOOSI *et al.*, 2012).

No entanto, em animais desprovidos de melanina, esses fatos não são relevantes. O aumento simples de EROs pode desencadear uma série de eventos. O aumento de EROs pode desencadear a senescência, seguida da liberação de IL-6, um acelerador autoimune. Dessa forma há a facilitação do início e progressão do vitiligo (WANG *et al.*, 2014). Mesmo os níveis sendo altos de EROs nos animais tratados com *P. venusta*, não houve alteração da citocina IL-6. Consequentemente, não há aceleração da resposta imune, sugerindo que não ocorra nem o desencadeamento, nem a progressão da doença.

Além disso, L-DOPA, outro intermediário da melanogênese, possui a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos T e monócitos, dessa forma *down*-regulando as respostas imunes e inflamatórias (FELLER *et al.*, 2014).

Como houve aumento dos níveis epidermais de melanina e aumento da pigmentação dermal dos animais tratados quando comparados com animais somente induzidos com monobenzona, pode-se deduzir que houve inibição de citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos e monócitos. Além disso, os dados histológicos mostraram diminuição do infiltrado celular nos grupos tratados com *P. venusta*, levando a mais uma característica importante produzida pelo EHPV. Assim, além de diminuir a produção de citocinas através do processo de melanogênese, a diminuição de células no local é um adicional na diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Apesar de não verificar especificamente a presença de monócitos no local, foi visto anteriormente, no

modelo de OC, que o EHPV diminuiu a atividade da enzima NAG, a qual avalia indiretamente a atividade e presença de células mononucleares no local.

Os imunossupressores podem ser usados como alternativa para os corticoides tópicos no vitiligo, com a vantagem de não causar atrofia, telangiectasia ou efeitos adversos oculares (XU *et al.*, 2009). No entanto, o efeito adverso mais considerado nesse estudo e que foi essencial para a escolha da droga de referência, é que os corticoides podem alterar a pigmentação (hipopigmentação ou hiperpigmentação), podendo resultar na alteração da resposta dos animais (GARROTT; WALLAND, 2004).

O tacrolimo é uma opção terapêutica porque atua nas células T e mastócitos, inibindo a ativação de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, cujos níveis estão aumentados na pele lesionada de vitiligo (GRIMES *et al.*, 2004). Além disso, previne a liberação de mediadores pró-inflamatórios em mastócitos pela degranulação (BERTI *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009). Promove, também, a migração celular e ativação da tirosinase em melanócitos humanos (KANG; CHOI, 2006).

Sua estrutura molecular permite penetração cutânea efetiva, mas não tão intensa quanto a dos corticoides tópicos, prevenindo, assim, alta absorção sistêmica (NGHIEM *et al.*, 2002). Como os inibidores de calcineurina tópicos possuem alta afinidade pelos seus receptores e baixa absorção, eles não causam esses sinais/sintomas (GUTFREUND *et al.*, 2013).

Um dos problemas encontrados na terapia com imunossupressores é relacionado com sua alta absorção, causando, dentre outros efeitos, a alteração de órgãos linfoides ou até mesmo mudança de suas atividades. Esses órgãos podem ser divididos em primários ou secundários. Os órgãos linfoides primários são representados, principalmente, pela medula óssea e timo, nos quais os linfócitos se originam, maturam e são suprimidos/inativados se reconhecerem auto-antígenos (WILSON; VILLADANGOS, 2004; REZZANI *et al.*, 2014).

Depois de maduros, os linfócitos deixam o timo e migram para outros tecidos, como linfonodos e baço (órgãos linfoides secundários), sendo esses os principais responsáveis pelas respostas imunes primárias. Suas estruturas e microambientes são especializados com o intuito de promover interações controladas de células imunes, gerando respostas rápidas e apropriadas.

Assim, os tecidos linfoides secundários nada mais são do que locais das defesas inata e adquirida do organismo (RANDALL *et al.*, 2008).

Se o tratamento promovesse atrofia desses órgãos, significaria que, provavelmente, o efeito imunossupressor seria muito exacerbado, levando a efeitos indesejáveis. Como observado no estudo, não houve alterações significativas tanto na morfologia quanto no peso dos órgãos avaliados. Os animais não foram tratados somente com as preparações contendo *P. venusta*, cujo tratamento seria ideal para avaliação da toxicidade. No entanto, mesmo com a administração concomitante do extrato com a monobenzona, não houve alterações significativas que possam comprometer a segurança dessa planta. Avaliações futuras que garantam isso devem ser realizadas, visto que dos grandes problemas encontrados na pesquisa é justamente a falta de segurança apresentada por alguns compostos.

A determinação da toxicidade de plantas é necessária visto que o uso de algumas medicinas tradicionais pode resultar em vários casos de toxicidade aguda, levando ao aumento da morbidade ou mortalidade (REID *et al.*, 2006). Mesmo que o efeito de uma determinada planta medicinal seja eficiente e até mesmo bem documentado, normalmente a toxicidade é pouco explorada em contraste com pesquisa de drogas tradicionais (HARTMANN *et al.*, 2004; SUTER, 2006; OUEDRAOGO *et al.*, 2012).

Além da avaliação dos órgãos, nesse estudo avaliamos se a *P. venusta* poderia induzir dano no DNA, através da metodologia de genotoxicidade pelo método do cometa.

A genotoxicidade pode ser resultado de uma grande variedade de danos no material genético (OUEDRAOGO *et al.*, 2012). Nesse estudo, a *P. venusta*, nas concentrações avaliadas, não causou dano algum. Apesar das limitações do ensaio *in vitro*, ele é extremamente útil para avaliações posteriores.

Concomitantemente, estudos mostraram que há presença de alguns compostos no EHPV, como verbascosídeo, rutina e alantoína. Estudos posteriores poderão mostrar se esses metabólitos estão ou não envolvidos nos resultados obtidos, bem como na importância dos mesmos na ação do extrato no vitiligo.

Uma grande variedade de polifenóis tem sido relatada possuir propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Os flavonoides representam o mais comum e mais distribuído grupo de fenóis encontrados em plantas (HARBORNE, 1986).

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas com mais de nove mil compostos conhecidos (BUER *et al.*, 2010). Dependendo do tipo de reação e do substrato, várias classes de flavonoides podem ser formados, entre elas: aurona, dihidrochalcona, flavanonol (dihidroflavonol), isoflavona, flavona, flavonol, leucoantocianidina, antocianina e proantocianidina. Esses sofrem modificações enzimáticas, as quais causam alterações na sua solubilidade, reatividade e até mesmo estabilidade. Sob condições normais, a maioria dos flavonoides estão presentes na forma glicosilada (MIERZIAK *et al.*, 2014).

Como existe um grande número de classes, com estruturas e ligantes bastante variados, esses metabólitos desempenham uma grande variedade de funções nas plantas. Merece destaque sua propriedade antioxidante, a qual é diretamente relacionada com a estrutura molecular, permitindo que haja a manutenção do estado redox nas células (RICE-EVANS *et al.*, 1996; SEYOUM *et al.*, 2006). A diminuição da produção ou a eliminação das EROs ocorre através da supressão do oxigênio *singlet*; inibição de enzimas que geram EROs, como cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX); quelando íons de metais, os quais podem catalisar produção de espécies reativas; extinguindo cascatas de reações de radicais livres na peroxidação lipídica; além de atuar na reciclagem de outros antioxidantes (COTELLE *et al.*, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996; ARORA *et al.*, 2000; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HIGDON; FREI, 2003; MIERZIAK *et al.*, 2014).

A rutina (3-rhamnosyl-glucosylquercetin) é um glicosídeo flavonol abundante em muitas plantas comestíveis. Estudos mostram que possui atividade bactericida, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória (CHOI *et al.*, 2014). Drowa e cols. (1998) testaram a ação da rutina no conteúdo de melanina em células da linhagem B16; no entanto foi capaz de inibir a formação de melanina e a maturação de melanossomos nos estágios 2 e 3, os quais possuem baixo conteúdo de melanina (DREWA *et al.*, 1998).

Atualmente, um estudo realizado por Takekoshi e cols. (2014) mostrou que esse flavonoide não foi capaz de alterar o conteúdo de melanina em uma linhagem de melanoma humano, bem como não alterou a atividade da

tirosinase *in vitro* (TAKEKOSHI *et al.*, 2014). No entanto, quando a rutina foi usada como precursora, após hidrólise e glicosilação, formou glicosídeos de quercetina, sendo esta capaz, então, de aumentar a produção de melanina (YAMAUCHI *et al.*, 2014). A rutina é um composto hidrofílico capaz de ficar na superfície da pele, com alto potencial antioxidante (ALONSO *et al.*, 2014). Dessa forma, apesar de a rutina não exercer efeitos sobre a produção de melanina, ela pode atuar na produção de EROs, sendo capaz de sequestrar várias espécies reativas e inibir sua concentração na corrente sanguínea (MURAKAMI *et al.*, 2008). Além disso, pode ser convertida em quercetina, essa sim possuindo ação direta na formação da melanina.

O verbascosídeo, também conhecido como acetosídeo, é um glicosídeo fenilentanoide com diferentes atividades, entre elas atividades citotóxica e anti-inflamatória. Além disso, possui atividade antioxidante, diminui atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e reduz ativação translocação nuclear de NF-kB, modulando, assim, reações inflamatórias (SPERANZA *et al.*, 2010). Suas propriedades anti-inflamatórias foram demonstradas em vários modelos, como modelo de inflamação intestinal, no qual reduziu moléculas pró-inflamatórias. Nos modelos de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico e edema induzido pela carragenina, verbascosídeo mostrou inibição da produção de histamina e bradicinina. Também exercem efeitos inibitórios em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e IFN- γ , sendo potentes inibidores de óxido nítrico, TNF- α e IL-12 (CARRILLO-OCAMPO *et al.*, 2013). Suas ações anti-inflamatórias foram confirmadas em ensaio *in vitro*, no qual o verbascosídeo diminuiu a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias em cultura primária de queratinócitos humanos (PARK *et al.*, 2010).

Apesar de sua excelente atividade antioxidante, seu caráter altamente hidrofílico pode ser uma limitação para diferentes tipos de formulação (VERTUANI *et al.*, 2011). De forma semelhante àquela encontrada na rutina, o verbascosídeo inibe a produção de melanina estimulada pela ação do α -MSH, através da inativação de adenilato ciclase (SONG; SIM, 2009) e pela *downregulation* da tirosinase através da ativação de ERK (SON *et al.*, 2011).

Por fim, a alantoína é capaz de modular respostas inflamatórias, possivelmente através da inibição da quimiotaxia de células inflamatórias,

prevenindo, assim, a liberação de EROs responsáveis pelo estresse oxidativo (ARAUJO *et al.*, 2010).

Apesar da riqueza de evidências *in vitro* e *in vivo*, até o momento não há evidência de benefícios clínicos, em estudos controlados, em seres humanos, deixando em aberto a questão da biodisponibilidade e biotransformação, por exemplo. Investigações futuras são necessárias para elucidar o mecanismo de ação dessa espécie, bem como para avaliar sua segurança. No entanto, *P. venusta* pode ser utilizada como uma opção para o controle do vitiligo.

Os resultados obtidos mostraram claramente uma diferença em alguns ensaios realizados nesse trabalho em grupo de animais tratados com EHPV administrado por duas vias diferentes.

Quando a via oral é utilizada, deve-se levar em conta que enzimas da microflora intestinal podem metabolizar substâncias. Esses microorganismos são encontrados, em condições fisiológicas, somente no intestino e esse metabolismo enzimático se aplica somente para aquelas substâncias que não são absorvidas na parte superior do intestino. A desvantagem dessa via é que ocorre a alteração de compostos antes de serem absorvidos no intestino. Se os metabólitos não são biologicamente ativos, a administração dessas substâncias pode não ser afetada (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012).

Deve ser considerado que a maioria dos produtos naturais é, frequentemente, uma pró-droga. Em geral, eles necessitam da conversão metabólica para se tornarem agentes farmacologicamente ativos. Existe um aumento no número de estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciando que os flavonoides (encontrados nas folhas de *P. venusta*) podem ser pró-drogas potenciais (BUTTERWECK; NAHRSTEDT, 2012). Sem dúvida alguma, a via de administração interfere e é de extrema importância, uma vez que é a maior influência na farmacocinética de compostos.

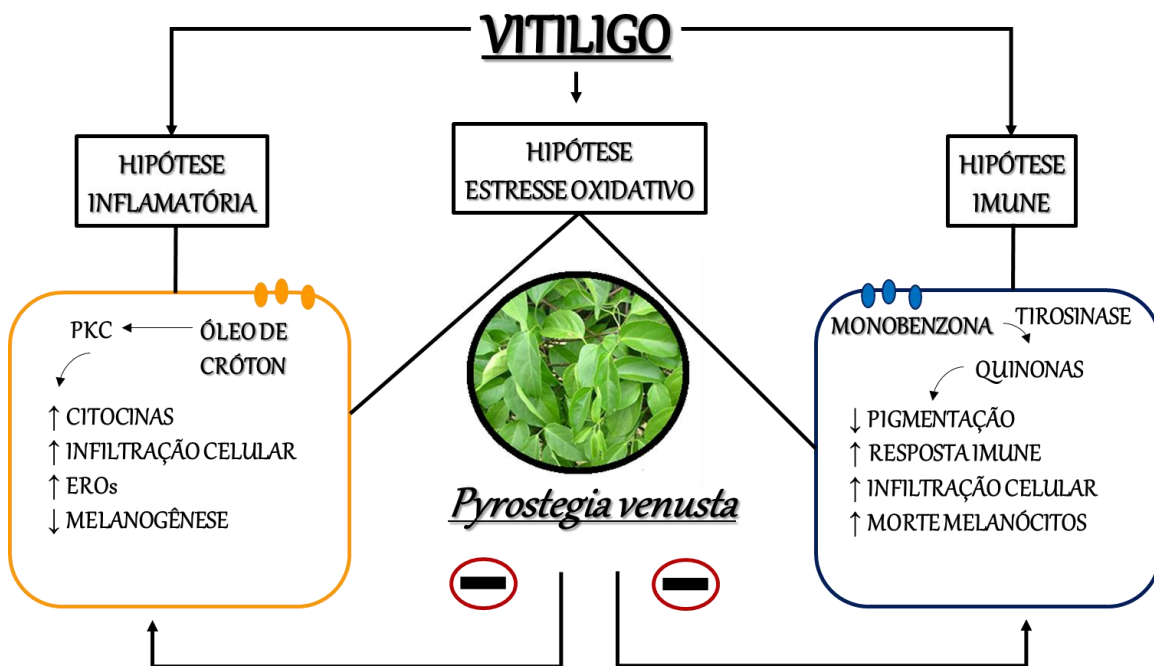
Considerando que os dados obtidos mostraram, algumas vezes, resultados diferentes para as duas vias de administração, mas que esses resultados complementam características que podem ser encontradas em pacientes com vitiligo, sugere-se que os tratamentos são complementares. Assim, podem ser utilizados concomitantemente ou em diferentes fases da doença.

Os resultados *in vitro* foram publicados na revista *Journal of Ethnopharmacology*. **Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *P. venusta* on murine B16F10 melanoma.** PMID: 22504061.

Parte dos resultados *in vivo* foram submetidos para a revista *Journal of Ethnopharmacology*. **Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo.** JEP-D-14-03268.

8 CONCLUSÃO

De uma forma geral, foram investigados os possíveis efeitos do extrato hidroetanólico da *P. venusta* em modelos *in vitro* e *in vivo*, os quais são capazes de mimetizar algumas características da patogênese envolvida no vitiligo. Como é uma doença bastante complexa, mas que certamente envolve mecanismos autoimunes, inflamatórios, bioquímicos, bem como mecanismos relacionados ao estresse oxidativo, podemos afirmar que a *P. venusta* tem potencial para ser usada no tratamento desta doença. Como o tratamento foi capaz de atuar em diferentes parâmetros relacionados à etiopatogênese do vitiligo, parece ser uma ferramenta potencial para o tratamento da doença.



REFERÊNCIAS

ABBAS, O.; MAHALINGAM, M. Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses. **Br J Dermatol**, v.161, n.2, Aug, p.228-36. 2009.

ABDULLA, S. J.; DESGROSEILLIERS, J. P. Treatment of vitiligo with narrow-band ultraviolet B: advantages and disadvantages. **J Cutan Med Surg**, v.12, n.4, Jul-Aug, p.174-9. 2008.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. *et al.* Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, v.8, n.9, Sep, p.942-9. 2007.

ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A. Depigmentation therapies for normal skin in vitiligo universalis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.25, n.7, Jul, p.749-57. 2011.

ALI, S. A.; MEITEI, K. V. Nigella sativa seed extract and its bioactive compound thymoquinone: the new melanogens causing hyperpigmentation in the wall lizard melanophores. **J Pharm Pharmacol**, v.63, n.5, May, p.741-6. 2011.

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, Sep, p.473-91. 2011.

ALKHATEEB, A. *et al.* Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. **Pigment Cell Res**, v.16, n.3, Jun, p.208-14. 2003.

ALONSO, C. *et al.* Antioxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols. **Free Radic Biol Med**, v.75, Oct, p.149-55. 2014.

ANDO, H. *et al.* Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents. **J Cell Physiol**, v.163, n.3, Jun, p.608-14. 1995.

ANDO, H. *et al.* Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. **J Invest Dermatol**, v.127, n.4, Apr, p.751-61. 2007.

ARAUJO, L. U. *et al.* Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cir Bras**, v.25, n.5, Oct, p.460-6. 2010.

ARITA, Y. *et al.* Growth of human melanocyte cultures supported by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate is mediated through protein kinase C activation. **Cancer Res**, v.52, n.16, Aug 15, p.4514-21. 1992.

ARONI, K. *et al.* Increased angiogenesis and mast cells in the centre compared to the periphery of vitiligo lesions. **Arch Dermatol Res**, v.302, n.8, Oct, p.601-7. 2010.

ARORA, A. *et al.* Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arch Biochem Biophys**, v.373, n.1, Jan 1, p.102-9. 2000.

BABITHA, S. *et al.* A stimulatory effect of *Cassia occidentalis* on melanoblast differentiation and migration. **Arch Dermatol Res**, v.303, n.3, Apr, p.211-6. 2011.

BASAK, P. Y. *et al.* The role of helper and regulatory T cells in the pathogenesis of vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v.60, n.2, Feb, p.256-60. 2009.

BELLEI, B. *et al.* Vitiligo: a possible model of degenerative diseases. **PLoS One**, v.8, n.3, p.e59782. 2013.

BEN-SASSON, S. Z. *et al.* IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.17, Apr 28, p.7119-24. 2009.

BERNARD, B. A. [The biology of hair follicle]. **J Soc Biol**, v.199, n.4, p.343-8. 2005.

BERTI, S. *et al.* Use of tacrolimus ointment in vitiligo alone or in combination therapy. **Skin Therapy Lett**, v.14, n.4, May, p.5-7. 2009.

BERTOLOTTO, C. *et al.* In B16 melanoma cells, the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter. **Oncogene**, v.16, n.13, Apr 2, p.1665-70. 1998.

BHATNAGAR, A. *et al.* Comparison of systemic PUVA and NB-UVB in the treatment of vitiligo: an open prospective study. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.21, n.5, May, p.638-42. 2007.

BIRLEA, S. A. *et al.* New insights on therapy with vitamin D analogs targeting the intracellular pathways that control repigmentation in human vitiligo. **Med Res Rev**, v.29, n.3, May, p.514-46. 2009.

BIROL, A. *et al.* Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1 alpha (IL1-alpha) levels in the lesional skin of patients with nonsegmental vitiligo. **Int J Dermatol**, v.45, n.8, Aug, p.992-3. 2006.

BOISSY, R. E.; MANGA, P. On the etiology of contact/occupational vitiligo. **Pigment Cell Res**, v.17, n.3, Jun, p.208-14. 2004.

BORENFREUND, E. P., J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. **Journal of tissue culture methods**, v.9, p.7-9. 1985.

BOTCHKAREVA, N. V. *et al.* Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v.8, n.1, Jun, p.76-9. 2003.

BOUWSTRA, J. A. *et al.* Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Prog Lipid Res**, v.42, n.1, Jan, p.1-36. 2003.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochim Biophys Acta**, v.1758, n.12, Dec, p.2080-95. 2006.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v.78, n.3, Mar, p.206-9. 1982.

BUER, C. S. *et al.* Flavonoids: new roles for old molecules. **J Integr Plant Biol**, v.52, n.1, Jan, p.98-111. 2010.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. **Planta Med**, v.78, n.8, May, p.747-54. 2012.

CARRILLO-OCAMPO, D. *et al.* Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. **Molecules**, v.18, n.10, p.12109-18. 2013.

CHAWLA, S. *et al.* Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. **Br J Dermatol**, v.159, n.6, Dec, p.1267-74. 2008.

CHEN, L. *et al.* Characterization of two novel small molecules targeting melanocyte development in zebrafish embryogenesis. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.25, n.4, Jul, p.446-53. 2012.

CHOI, K. S. *et al.* Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. **Arch Biochem Biophys**, v.559, Oct 1, p.38-45. 2014.

CHUNG, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, v.30, n.4, Apr 17, p.576-87. 2009.

CLAYTON, R. A double-blind trial of 0.05% clobetasol propionate in the treatment of vitiligo. **Br J Dermatol**, v.96, n.1, Jan, p.71-3. 1977.

COLUCCI, R. *et al.* Vitiligo: an update on current pharmacotherapy and future directions. **Expert Opin Pharmacother**, v.13, n.13, Sep, p.1885-99. 2012.

CONRICODE, K. M. *et al.* Activation of phospholipase D by protein kinase C. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. **J Biol Chem**, v.267, n.11, Apr 15, p.7199-202. 1992.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **Faseb j**, v.21, n.4, Apr, p.976-94. 2007.

COTELLE, N. *et al.* Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radic Biol Med**, v.20, n.1, p.35-43. 1996.

COTSARELIS, G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. **J Invest Dermatol**, v.126, n.7, Jul, p.1459-68. 2006.

CUCCHI, M. L. *et al.* Catecholamines increase in the urine of non-segmental vitiligo especially during its active phase. **Pigment Cell Res**, v.16, n.2, Apr, p.111-6. 2003.

D'ORAZIO, J. *et al.* UV Radiation and the Skin. **Int J Mol Sci**, v.14, n.6, p.12222-48. 2013.

DELL'ANNA, M. L. *et al.* In vitro research on vitiligo: strategies, principles, methodological options and common pitfalls. **Exp Dermatol**, v.21, n.7, Jul, p.490-6. 2012.

DELL'ANNA, M. L. *et al.* Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo. **J Invest Dermatol**, v.117, n.4, Oct, p.908-13. 2001.

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, Oct, p.406-11. 2006.

DENMAN, C. J. *et al.* HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. **J Invest Dermatol**, v.128, n.8, Aug, p.2041-8. 2008.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.7, Jul, p.1141-6. 2004.

DENTON, C. R. *et al.* Inhibition of melanin formation by chemical agents. **J Invest Dermatol**, v.18, n.2, Feb, p.119-35. 1952.

DESSINIOTI, C. *et al.* A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. **Exp Dermatol**, v.18, n.9, Sep, p.741-9. 2009.

DIEHL, S.; RINCON, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, v.39, n.9, Dec, p.531-6. 2002.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.519-50. 2009.

DOUAT-CASASSUS, C. *et al.* Covalent modification of a melanoma-derived antigenic peptide with a natural quinone methide. Preliminary chemical,

molecular modelling and immunological evaluation studies. **Mol Biosyst**, v.2, n.5, May, p.240-9. 2006.

DREWA, G. *et al.* The influence of rutin on the weight, metastasis and melanin content of B16 melanotic melanoma in C57BL/6 mice. **Neoplasma**, v.45, n.4, p.266-71. 1998.

DUBEY, R. C. M., K. Chemical components of *Pyrostegia venusta* flowers. **Journal of Indian Chemical Society**, v.53, p.378-381. 1976.

ELGOWEINI, M.; NOUR EL DIN, N. Response of vitiligo to narrowband ultraviolet B and oral antioxidants. **J Clin Pharmacol**, v.49, n.7, Jul, p.852-5. 2009.

ESKANDANI, M. *et al.* Oxidative stress level and tyrosinase activity in vitiligo patients. **Indian J Dermatol**, v.55, n.1, p.15-9. 2010.

ESMAEILI, B. *et al.* Expression of IL-17 and COX2 gene in peripheral blood leukocytes of vitiligo patients. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v.10, n.2, Jun, p.81-9. 2011.

EZZEDINE, K. *et al.* Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.25, n.3, May, p.E1-13. 2012.

FALABELLA, R. Vitiligo and the melanocyte reservoir. **Indian J Dermatol**, v.54, n.4, p.313-8. 2009.

FARIA, A. R. *et al.* Vitiligo - Part 2 - classification, histopathology and treatment. **An Bras Dermatol**, v.89, n.5, Sep, p.784-90. 2014.

FELDMANN, M. *et al.* Cytokines in autoimmune disorders. **Int Rev Immunol**, v.17, n.1-4, p.217-28. 1998.

FELLER, L. *et al.* Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. **Head Face Med**, v.10, p.8. 2014.

FELSTEN, L. M. *et al.* Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. **J Am Acad Dermatol**, v.65, n.3, Sep, p.493-514. 2011.

FERENCE, J. D.; LAST, A. R. Choosing topical corticosteroids. **Am Fam Physician**, v.79, n.2, Jan 15, p.135-40. 2009.

FERREIRA, A., HOUGHTON, BRAZ-FILHO. Chemical constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal importance. **Quím Nova**, v.23, p.42-46. 2000.

FINI, A. *et al.* Control of transdermal permeation of hydrocortisone acetate from hydrophilic and lipophilic formulations. **AAPS PharmSciTech**, v.9, n.3, p.762-8. 2008.

FIROOZ, A. *et al.* What patients with vitiligo believe about their condition. **Int J Dermatol**, v.43, n.11, Nov, p.811-4. 2004.

FISTAROL, S. K.; ITIN, P. H. Disorders of pigmentation. **J Dtsch Dermatol Ges**, v.8, n.3, Mar, p.187-201; quiz 201-2. 2010.

FULLER, B. B. *et al.* Down-regulation of tyrosinase mRNA levels in melanoma cells by tumor promoters and by insulin. **Mol Cell Endocrinol**, v.72, n.2, Aug 20, p.81-7. 1990.

GAFFEN, S. L. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. **Arthritis Res Ther**, v.6, n.6, p.240-7. 2004.

GARCIA-PEREZ, M. E. *et al.* Antipsoriatic drug development: challenges and new emerging therapies. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v.6, n.1, Jan, p.3-21. 2012.

GARG, B. J. *et al.* Topical treatment in vitiligo and the potential uses of new drug delivery systems. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.76, n.3, May-Jun, p.231-8. 2010.

GARG, R. *et al.* Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v.29, n.6, June 1, 2008, p.1249-1257. 2008.

GARROTT, H. M.; WALLAND, M. J. Glaucoma from topical corticosteroids to the eyelids. **Clin Experiment Ophthalmol**, v.32, n.2, Apr, p.224-6. 2004.

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, Jan, p.95-101. 2003.

GAUTHIER, Y. *et al.* A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? **Pigment Cell Res**, v.16, n.4, Aug, p.322-32. 2003.

GISONDI, P. *et al.* Pimecrolimus in dermatology: atopic dermatitis and beyond. **Int J Clin Pract**, v.59, n.8, Aug, p.969-74. 2005.

GLASSMAN, S. J. Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. **Clin Sci (Lond)**, v.120, n.3, Feb, p.99-120. 2011.

GRAZ, B. What is "clinical data"? Why and how can they be collected during field surveys on medicinal plants? **J Ethnopharmacol**, v.150, n.2, Nov 25, p.775-9. 2013.

GREGG, R. K. *et al.* Mechanisms of spatial and temporal development of autoimmune vitiligo in tyrosinase-specific TCR transgenic mice. **J Immunol**, v.184, n.4, Feb 15, p.1909-17. 2010.

GRIMES, P. E. *et al.* Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. **J Am Acad Dermatol**, v.51, n.1, Jul, p.52-61. 2004.

GUPTA, D. *et al.* Depigmentation therapies in vitiligo. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.78, n.1, Jan-Feb, p.49-58. 2012.

GUTFREUND, K. *et al.* Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: Properties, method and effectiveness of drug use. **Postepy Dermatol Alergol**, v.30, n.3, Jun, p.165-9. 2013.

HANN, S. K.; LEE, H. J. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. **J Am Acad Dermatol**, v.35, n.5 Pt 1, Nov, p.671-4. 1996.

HARBORNE, J. B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. **Prog Clin Biol Res**, v.213, p.15-24. 1986.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, Nov, p.481-504. 2000.

HARIHARAN, V. *et al.* Monobenzyl ether of hydroquinone and 4-tertiary butyl phenol activate markedly different physiological responses in melanocytes: relevance to skin depigmentation. **J Invest Dermatol**, v.130, n.1, Jan, p.211-20. 2010.

HARIHARAN, V. *et al.* Topical application of bleaching phenols; in-vivo studies and mechanism of action relevant to melanoma treatment. **Melanoma Res**, v.21, n.2, Apr, p.115-26. 2011.

HARRIS, J. E. *et al.* A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN-gamma for autoreactive CD8(+) T-cell accumulation in the skin. **J Invest Dermatol**, v.132, n.7, Jul, p.1869-76. 2012.

HARTMANN, A. *et al.* Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**, v.19, n.1, Jan, p.51-9. 2004.

HASSE, S. *et al.* Perturbed 6-tetrahydrobiopterin recycling via decreased dihydropteridine reductase in vitiligo: more evidence for H₂O₂ stress. **J Invest Dermatol**, v.122, n.2, Feb, p.307-13. 2004.

HEMPEL, S. L. *et al.* Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med**, v.27, n.1-2, Jul, p.146-59. 1999.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.43, n.1, p.89-143. 2003.

HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **Int Rev Immunol**, v.16, n.3-4, p.249-84. 1998.

HIROBE, T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. **Pigment Cell Res**, v.18, n.1, Feb, p.2-12. 2005.

HIROBE, T. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a keratinocyte-derived factor involved in regulating the proliferation and differentiation of neonatal mouse epidermal melanocytes in culture. **Exp Cell Res**, v.297, n.2, Jul 15, p.593-606. 2004.

HUANG, C. L. *et al.* Vitiligo: a manifestation of apoptosis? **Am J Clin Dermatol**, v.3, n.5, p.301-8. 2002.

HYUN, S. K. *et al.* Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. **Biol Pharm Bull**, v.31, n.1, Jan, p.154-8. 2008.

IMOKAWA, G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. **Pigment Cell Res**, v.17, n.2, Apr, p.96-110. 2004.

JIMBOW, K. *et al.* Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. **Br J Dermatol**, v.144, n.1, Jan, p.55-65. 2001.

KAGEYAMA, A. *et al.* Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. **J Biol Chem**, v.279, n.26, Jun 25, p.27774-80. 2004.

KANG, H. Y.; CHOI, Y. M. FK506 increases pigmentation and migration of human melanocytes. **Br J Dermatol**, v.155, n.5, Nov, p.1037-40. 2006.

KELSH, R. N. *et al.* Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. **Development**, v.123, Dec, p.369-89. 1996.

KEMP, E. H. *et al.* Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). **Clin Exp Immunol**, v.109, n.3, Sep, p.495-500. 1997.

KEMP, E. H. *et al.* Autoantibodies to tyrosinase-related protein-1 detected in the sera of vitiligo patients using a quantitative radiobinding assay. **Br J Dermatol**, v.139, n.5, Nov, p.798-805. 1998.

Molecular mapping of epitopes on melanocyte-specific protein Pmel17 which are recognized by autoantibodies in patients with vitiligo. **Clin Exp Immunol**, v.124, n.3, Jun, p.509-15. 2001.

KEMP, E. H. *et al.* The melanin-concentrating hormone receptor 1, a novel target of autoantibody responses in vitiligo. **J Clin Invest**, v.109, n.7, Apr, p.923-30. 2002.

KERN, F. *et al.* Ras and Raf pathways in epidermis development and carcinogenesis. **Br J Cancer**, v.104, n.2, Jan 18, p.229-34. 2011.

KHAN, R. *et al.* Circulatory levels of T-cell cytokines (interleukin [IL]-2, IL-4, IL-17, and transforming growth factor-beta) in patients with vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v.66, n.3, Mar, p.510-1. 2012.

KIM, B. S. *et al.* New measure of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. **Environ Mol Mutagen**, v.40, n.1, p.50-6. 2002.

KIM, S. M. *et al.* The efficacy of low-dose oral corticosteroids in the treatment of vitiligo patients. **Int J Dermatol**, v.38, n.7, Jul, p.546-50. 1999.

KLARQUIST, J. *et al.* Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.23, n.2, Apr, p.276-86. 2010.

KOPERA, D. Historical aspects and definition of vitiligo. **Clin Dermatol**, v.15, n.6, Nov-Dec, p.841-3. 1997.

KROLL, T. M. *et al.* 4-Tertiary butyl phenol exposure sensitizes human melanocytes to dendritic cell-mediated killing: relevance to vitiligo. **J Invest Dermatol**, v.124, n.4, Apr, p.798-806. 2005.

KRUGER, C.; SCHALLREUTER, K. U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. **Int J Dermatol**, v.51, n.10, Oct, p.1206-12. 2012.

KUMAR, R. *et al.* Development of melanocyte-keratinocyte co-culture model for controls and vitiligo to assess regulators of pigmentation and melanocytes. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.78, n.5, Sep-Oct, p.599-604. 2012.

KUMAR, S. *et al.* Role of histopathology in vitiligo. **J Indian Med Assoc**, v.109, n.9, Sep, p.657-8, 665. 2011.

KUZUMAKI, T. *et al.* Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. **Exp Cell Res**, v.207, n.1, Jul, p.33-40. 1993.

LABERGE, G. *et al.* Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. **Pigment Cell Res**, v.18, n.4, Aug, p.300-5. 2005.

LADUCA, J. R.; GASPARI, A. A. Targeting tumor necrosis factor alpha. New drugs used to modulate inflammatory diseases. **Dermatol Clin**, v.19, n.4, Oct, p.617-35. 2001.

LAMKANFI, M. *et al.* Deregulated inflammasome signaling in disease. **Immunol Rev**, v.243, n.1, Sep, p.163-73. 2011.

LAN, C. C. *et al.* FK506 promotes melanocyte and melanoblast growth and creates a favourable milieu for cell migration via keratinocytes: possible

mechanisms of how tacrolimus ointment induces repigmentation in patients with vitiligo. **Br J Dermatol**, v.153, n.3, Sep, p.498-505. 2005.

LANG, K. S. *et al.* HLA-A2 restricted, melanocyte-specific CD8(+) T lymphocytes detected in vitiligo patients are related to disease activity and are predominantly directed against MelanA/MART1. **J Invest Dermatol**, v.116, n.6, Jun, p.891-7. 2001.

LE POOLE, I. C.; LUITEN, R. M. Autoimmune etiology of generalized vitiligo. **Curr Dir Autoimmun**, v.10, p.227-43. 2008.

LE POOLE, I. C. *et al.* Tenascin is overexpressed in vitiligo lesional skin and inhibits melanocyte adhesion. **Br J Dermatol**, v.137, n.2, Aug, p.171-8. 1997.

LE POOLE, I. C. *et al.* Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v.9, n.1, Jan, p.68-72. 2004.

LEE, A. Y.; NOH, M. The regulation of epidermal melanogenesis via cAMP and/or PKC signaling pathways: insights for the development of hypopigmenting agents. **Arch Pharm Res**, v.36, n.7, Jul, p.792-801. 2013.

LEVY, C. *et al.* MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends Mol Med**, v.12, n.9, Sep, p.406-14. 2006.

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), Feb, p.263-77. 1990.

LIN, Z. *et al.* Amides from Piper nigrum L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in-vitro. **J Pharm Pharmacol**, v.59, n.4, Apr, p.529-36. 2007.

LINTHORST HOMAN, M. W. *et al.* The burden of vitiligo: patient characteristics associated with quality of life. **J Am Acad Dermatol**, v.61, n.3, Sep, p.411-20. 2009.

LORENZI, H. S., H.M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** Nova Odessa, SP: Plantarum. 1995

LUGER, T. A.; SCHWARZ, T. Evidence for an epidermal cytokine network. **J Invest Dermatol**, v.95, n.6 Suppl, Dec, p.100s-104s. 1990.

MAGALHÃES, E. A. S. J., G.J.; DE CAMPOS, T.A.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. The evaluation of the genotoxic potency of the *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, crude extract on bone marrow of mice. **Rev Bras Farmacogn**, v.20, p.65-69. 2010.

MAJUMDER, P. P. *et al.* Pattern of familial aggregation of vitiligo. **Arch Dermatol**, v.129, n.8, Aug, p.994-8. 1993.

MALISZEWSKI, C. R. *et al.* Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. **J Immunol**, v.144, n.8, Apr 15, p.3028-33. 1990.

MANINI, P. *et al.* A reactive ortho-quinone generated by tyrosinase-catalyzed oxidation of the skin depigmenting agent monobenzone: self-coupling and thiol-conjugation reactions and possible implications for melanocyte toxicity. **Chem Res Toxicol**, v.22, n.8, Aug, p.1398-405. 2009.

MARESCA, V. *et al.* Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. **J Invest Dermatol**, v.109, n.3, Sep, p.310-3. 1997.

MARTINEZ-ESPARZA, M. *et al.* Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. **Eur J Biochem**, v.255, n.1, Jul 1, p.139-46. 1998.

MCCULLY, M. L. *et al.* Epidermis instructs skin homing receptor expression in human T cells. **Blood**, v.120, n.23, Nov 29, p.4591-8. 2012.

MEYER, K. C. *et al.* Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. **Br J Dermatol**, v.159, n.5, Nov, p.1077-85. 2008.

MIDDELKAMP-HUP, M. A. *et al.* Treatment of vitiligo vulgaris with narrow-band UVB and oral *Polypodium leucotomos* extract: a randomized double-blind placebo-controlled study. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.21, n.7, Aug, p.942-50. 2007.

MIERZIAK, J. *et al.* Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v.19, n.10, p.16240-16265. 2014.

MILLINGTON, G. W.; LEVELL, N. J. Vitiligo: the historical curse of depigmentation. **Int J Dermatol**, v.46, n.9, Sep, p.990-5. 2007.

MINIATI, A. *et al.* Stimulated human melanocytes express and release interleukin-8, which is inhibited by luteolin: relevance to early vitiligo. **Clin Exp Dermatol**, v.39, n.1, Jan, p.54-7. 2014.

MIOT, L. D. *et al.* [Physiopathology of melasma]. **An Bras Dermatol**, v.84, n.6, Nov-Dec, p.623-35. 2009.

MOHLER, T. *et al.* Regulation of interleukin-8 mRNA expression and protein secretion in a melanoma cell line by tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. **Melanoma Res**, v.6, n.4, Aug, p.307-11. 1996.

MORETTI, S. *et al.* Keratinocyte dysfunction in vitiligo epidermis: cytokine microenvironment and correlation to keratinocyte apoptosis. **Histol Histopathol**, v.24, n.7, Jul, p.849-57. 2009.

MORETTI, S. *et al.* New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. **Pigment Cell Res**, v.15, n.2, Apr, p.87-92. 2002.

MORRONE, A. *et al.* Catecholamines and vitiligo. **Pigment Cell Res**, v.5, n.2, Mar, p.65-9. 1992.

MOSENSON, J. A. *et al.* A central role for inducible heat-shock protein 70 in autoimmune vitiligo. **Exp Dermatol**, v.22, n.9, Sep, p.566-9. 2013.

MOSTAFA, N. M. E.-D., O.; SINGAB, A.N.B. *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers: A Botanical, Pharmacological and Phytochemical Review. **Med Aromat Plants**, v.2, n.3. 2013.

MOUZAKIS, J. A. *et al.* Rapid response of facial vitiligo to 308nm excimer laser and topical calcipotriene. **J Clin Aesthet Dermatol**, v.4, n.6, Jun, p.41-4. 2011.

MULEKAR, S. V.; ISEDEH, P. Surgical interventions for vitiligo: an evidence-based review. **Br J Dermatol**, v.169 Suppl 3, Oct, p.57-66. 2013.

MURAKAMI, M. *et al.* UVB-dependent generation of reactive oxygen species by catalase and IgG under UVB light: Inhibition by antioxidants and anti-inflammatory drugs. **Drug Discov Ther**, v.2, n.2, Apr, p.85-93. 2008.

MURANSKI, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v.112, n.2, Jul 15, p.362-73. 2008.

NAKAZAWA, K. *et al.* Modulation of normal human melanocyte dendricity by growth-promoting agents. **Pigment Cell Res**, v.6, n.6, Dec, p.406-16. 1993.

NAMAZI, M. R. Phenytoin as a novel anti-vitiligo weapon. **J Autoimmune Dis**, v.2, Nov 22, p.11. 2005.

Neurogenic dysregulation, oxidative stress, autoimmunity, and melanocytorrhagy in vitiligo: can they be interconnected? **Pigment Cell Res**, v.20, n.5, Oct, p.360-3. 2007.

NEDOSZYTKO, B. *et al.* Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. **Postepy Dermatol Alergol**, v.31, n.2, May, p.84-91. 2014.

NESTOR, M. *et al.* Polypodium leucotomos as an Adjunct Treatment of Pigmentary Disorders. **J Clin Aesthet Dermatol**, v.7, n.3, Mar, p.13-7. 2014.

NGHIEM, P. *et al.* Tacrolimus and pimecrolimus: from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol**, v.46, n.2, Feb, p.228-41. 2002.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Arch Dermatol Res**, v.302, n.2, Mar, p.71-83. 2010.

NICOLAIDOU, E.; KATSAMBAS, A. D. Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. **Clin Dermatol**, v.32, n.1, Jan-Feb, p.66-72. 2014.

NISHIMURA, E. K. *et al.* Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. **Nature**, v.416, n.6883, Apr 25, p.854-60. 2002.

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, Apr, p.407-13. 1999.

NORGAUER, J. *et al.* Tumor necrosis factor alpha induces upregulation of CXC-chemokine receptor type II expression and magnifies the proliferative activity of CXC-chemokines in human melanocytes. **Eur J Dermatol**, v.13, n.2, Mar-Apr, p.124-9. 2003.

NUMEROF, R. P. *et al.* Cytokines as potential therapeutic targets for inflammatory skin diseases. **Eur Cytokine Netw**, v.16, n.2, Jun, p.101-3. 2005.

OUEDRAOGO, M. *et al.* Review of current and "omics" methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **J Ethnopharmacol**, v.140, n.3, Apr 10, p.492-512. 2012.

OYARBIDE-VALENCIA, K. *et al.* Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. **Autoimmun Rev**, v.5, n.7, Aug, p.486-92. 2006.

PAN, M. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of traditional Chinese medicinal herbs. **J Tradit Complement Med**, v.1, n.1, Oct, p.8-24. 2011.

PARK, H. Y. *et al.* Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v.66, n.9, May, p.1493-506. 2009.

PARK, H. Y. *et al.* Topical application of a protein kinase C inhibitor reduces skin and hair pigmentation. **J Invest Dermatol**, v.122, n.1, Jan, p.159-66. 2004.

PARK, K. S. *et al.* Inhibitory Potencies of Several Iridoids on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2 Enzymes Activities, Tumor Necrosis factor-alpha and Nitric Oxide Production In Vitro. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.7, n.1, Mar, p.41-5. 2010.

PARSAD, D. *et al.* Effectiveness of oral Ginkgo biloba in treating limited, slowly spreading vitiligo. **Clin Exp Dermatol**, v.28, n.3, May, p.285-7. 2003.

PASSERON, T.; ORTONNE, J. P. Activation of the unfolded protein response in vitiligo: the missing link? **J Invest Dermatol**, v.132, n.11, Nov, p.2502-4. 2012.

PASSI, S. *et al.* Epidermal oxidative stress in vitiligo. **Pigment Cell Res**, v.11, n.2, Apr, p.81-5. 1998.

PATEL, A. B. *et al.* Clinicopathological correlation of acquired hypopigmentary disorders. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.79, n.3, May-Jun, p.376-82. 2013.

PAUS, R.; COTSARELIS, G. The biology of hair follicles. **N Engl J Med**, v.341, n.7, Aug 12, p.491-7. 1999.

PERCIVALLE, S. *et al.* Narrowband UVB phototherapy in vitiligo: evaluation of results in 53 patients. **G Ital Dermatol Venereol**, v.143, n.1, Feb, p.9-14. 2008.

PICARDO, M. *et al.* Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. **Pigment Cell Res**, v.7, n.2, Apr, p.110-5. 1994.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. **Acta Biochim Pol**, v.53, n.3, p.429-43. 2006.

PLONKA, P. M. *et al.* What are melanocytes really doing all day long...? **Exp Dermatol**, v.18, n.9, Sep, p.799-819. 2009.

PROST-SQUARCIONI, C. [Histology of skin and hair follicle]. **Med Sci (Paris)**, v.22, n.2, Feb, p.131-7. 2006.

RADAKOVIC-FIJAN, S. *et al.* Oral dexamethasone pulse treatment for vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v.44, n.5, May, p.814-7. 2001.

RAHMAN, S. *et al.* Nordihydroguaiaretic Acid from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Mitigates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Tumor Promotion Cascade in Mouse Skin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2011, p.734785. 2011.

RAMAKRISHNA, P.; RAJNI, T. Psychiatric morbidity and quality of life in vitiligo patients. **Indian J Psychol Med**, v.36, n.3, Jul, p.302-3. 2014.

RANDALL, T. D. *et al.* Development of secondary lymphoid organs. **Annu Rev Immunol**, v.26, p.627-50. 2008.

REID, K. A. *et al.* Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. **J Ethnopharmacol**, v.106, n.1, Jun 15, p.44-50. 2006.

REZZANI, R. *et al.* Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. **Age (Dordr)**, v.36, n.1, Feb, p.313-51. 2014.

RICE-EVANS, C. A. *et al.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**, v.20, n.7, p.933-56. 1996.

RICHMOND, J. M. *et al.* Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. **Curr Opin Immunol**, v.25, n.6, Dec, p.676-82. 2013.

RODRIGUEZ-MARTIN, M. *et al.* Randomized, double-blind clinical trial to evaluate the efficacy of topical tacalcitol and sunlight exposure in the treatment of adult nonsegmental vitiligo. **Br J Dermatol**, v.160, n.2, Feb, p.409-14. 2009.

RORDAM, O. M. *et al.* Successful treatment of extensive vitiligo with monobenzene. **J Clin Aesthet Dermatol**, v.5, n.12, Dec, p.36-9. 2012.

ROY, P. *et al.* In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **J Ethnopharmacol**, v.140, n.1, Mar 6, p.186-92. 2012.

ROY, P. *et al.* Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **BMC Complement Altern Med**, v.11, p.69. 2011.

ROY, S. Melanin, melanogenesis, and vitiligo. **Fortschr Chem Org Naturst**, v.88, p.131-85. 2007.

SÁNCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v.58, n.5, p.877-879. 1999.

SANDOVAL-CRUZ, M. *et al.* Immunopathogenesis of vitiligo. **Autoimmun Rev**, v.10, n.12, Oct, p.762-5. 2011.

SANDWITH N.Y.; HUNT, D. R. **Bignoneaceas**. Santa Catarina: Flora Ilustrada Catarinense, v.1. 1974

SATYAVATHI, M. R., M.; NARAYANA, L.L. A note on the phytochemical constituents of some Bignoniaceae. **Current Science India**, v.53, p.711-712. 1984.

SCALON , V., LIMA, SOUZA, MUSSURY. Pregerminative treatments and incubation temperatures on the germination of “cipó-de-São-João” (*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers)-Bignoniaceae. **Rev Bras Plantas Med**, v.10, p.37-42. 2008.

SCHACKE, H. *et al.* Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v.96, n.1, Oct, p.23-43. 2002.

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, Feb, p.139-40; discussion 141-60. 2008.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. **Exp Dermatol**, v.17, n.5, May, p.395-404. 2008.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* From basic research to the bedside: efficacy of topical treatment with pseudocatalase PC-KUS in 71 children with vitiligo. **Int J Dermatol**, v.47, n.7, Jul, p.743-53. 2008.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. **Dermatology**, v.188, n.4, p.269-75. 1994.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its

successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v.4, n.1, Sep, p.91-6. 1999.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. **Arch Dermatol Res**, v.288, n.1, p.14-8. 1996.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. **Science**, v.263, n.5152, Mar 11, p.1444-6. 1994.

SCHALLREUTER, K. U. *et al.* Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. **Biochim Biophys Acta**, v.1226, n.2, May 25, p.181-92. 1994.

SCHWEIKARDT, T. *et al.* A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. **Pigment Cell Res**, v.20, n.5, Oct, p.394-401. 2007.

SCOTT, G. A. *et al.* sPLA2-X stimulates cutaneous melanocyte dendricity and pigmentation through a lysophosphatidylcholine-dependent mechanism. **J Invest Dermatol**, v.126, n.4, Apr, p.855-61. 2006.

SEHGAL, V. N. *et al.* Biologics in dermatology: an integrated review. **Indian J Dermatol**, v.59, n.5, Sep, p.425-41. 2014.

SEYOUM, A. *et al.* Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v.67, n.18, Sep, p.2058-70. 2006.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, v.10, n.2, Feb, p.89-102. 2010.

SINGH, S. *et al.* Serum concentration of IL-6, IL-2, TNF-alpha, and IFNgamma in Vitiligo patients. **Indian J Dermatol**, v.57, n.1, Jan, p.12-4. 2012.

SLOMINSKI, A. *et al.* Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. **Int J Cancer**, v.124, n.6, Mar 15, p.1470-7. 2009.

SON, Y. O. *et al.* Acteoside inhibits melanogenesis in B16F10 cells through ERK activation and tyrosinase down-regulation. **J Pharm Pharmacol**, v.63, n.10, Oct, p.1309-19. 2011.

SONG, H. S.; SIM, S. S. Acteoside inhibits alpha-MSH-induced melanin production in B16 melanoma cells by inactivation of adenylyl cyclase. **J Pharm Pharmacol**, v.61, n.10, Oct, p.1347-51. 2009.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol Biol**, v.113, p.203-12. 1999.

SPERANZA, L. *et al.* Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside. **Phytother Res**, v.24, n.9, Sep, p.1398-404. 2010.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v.346, n.6283, Aug 2, p.425-34. 1990.

SRAVANI, P. V. *et al.* Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.75, n.3, May-Jun, p.268-71. 2009.

STANLEY, P. L. *et al.* Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v.4, n.4, p.262-71. 1991.

STEITZ, J. *et al.* Peripheral CD8+ T cell tolerance against melanocytic self-antigens in the skin is regulated in two steps by CD4+ T cells and local inflammation: implications for the pathophysiology of vitiligo. **J Invest Dermatol**, v.124, n.1, Jan, p.144-50. 2005.

SUTER, W. Predictive value of in vitro safety studies. **Curr Opin Chem Biol**, v.10, n.4, Aug, p.362-6. 2006.

SUTTON, C. E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. **Immunity**, v.31, n.2, Aug 21, p.331-41. 2009.

SWOPE, V. B. *et al.* Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. **J Invest Dermatol**, v.96, n.2, Feb, p.180-5. 1991.

SWOPE, V. B. *et al.* A new role for epidermal cell-derived thymocyte activating factor/IL-1 as an antagonist for distinct epidermal cell function. **J Immunol**, v.142, n.6, Mar 15, p.1943-9. 1989.

SZCZURKO, O.; BOON, H. S. A systematic review of natural health product treatment for vitiligo. **BMC Dermatol**, v.8, p.2. 2008.

SZCZURKO, O. *et al.* Ginkgo biloba for the treatment of vitiligo vulgaris: an open label pilot clinical trial. **BMC Complement Altern Med**, v.11, p.21. 2011.

TADA, H. *et al.* An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**, v.93, n.2, Nov 6, p.157-65. 1986.

TAIEB, A. Vitiligo as an inflammatory skin disorder: a therapeutic perspective. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.25, n.1, Jan, p.9-13. 2012.

TAIEB, A.; PICARDO, M. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. **Pigment Cell Res**, v.20, n.1, Feb, p.27-35. 2007.

TAKEKOSHI, S. *et al.* Flavonoids enhance melanogenesis in human melanoma cells. **Tokai J Exp Clin Med**, v.39, n.3, p.116-21. 2014.

TARLE, R. G. *et al.* Vitiligo--part 1. **An Bras Dermatol**, v.89, n.3, May-Jun, p.461-70. 2014.

TAY, S. S. *et al.* The Skin-Resident Immune Network. **Curr Dermatol Rep**, v.3, p.13-22. 2014.

TOLLESON, W. H. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v.23, n.2, p.105-61. 2005.

TOOSI, S. *et al.* Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. **J Invest Dermatol**, v.132, n.11, Nov, p.2601-9. 2012.

TSUBOI, T. *et al.* Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma. **Pigment Cell Res**, v.11, n.5, Oct, p.275-82. 1998.

VAN DEN BOORN, J. G. *et al.* Monobenzene-induced depigmentation: from enzymatic blockade to autoimmunity. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.24, n.4, Aug, p.673-9. 2011.

VAN DEN WIJNGAARD, R. *et al.* Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. **Lab Invest**, v.80, n.8, Aug, p.1299-309. 2000.

VAN GEEL, N. *et al.* New insights in segmental vitiligo: case report and review of theories. **Br J Dermatol**, v.166, n.2, Feb, p.240-6. 2012.

VELOSO, C. C. *et al.* Pyrosteugia venusta attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **J Ethnopharmacol**, v.132, n.1, Oct 28, p.355-8. 2010.

VERTUANI, S. *et al.* Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. **Molecules**, v.16, n.8, p.7068-80. 2011.

WANG, C. Q. *et al.* Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions. **PLoS One**, v.6, n.4, p.e18907. 2011.

WANG, S. *et al.* Interferon-gamma induces senescence in normal human melanocytes. **PLoS One**, v.9, n.3, p.e93232. 2014.

WANG, X.; ERF, G. F. Melanocyte-specific cell mediated immune response in vitiliginous Smyth line chickens. **J Autoimmun**, v.21, n.2, Sep, p.149-60. 2003.

WANG, X. *et al.* Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. **World J Gastroenterol**, v.8, n.1, Feb, p.103-7. 2002.

WANKOWICZ-KALINSKA, A. *et al.* Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T cells to Type-1-like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. **Lab Invest**, v.83, n.5, May, p.683-95. 2003.

WESTERHOF, W. Evolutionary, biologic, and social aspects of skin color. **Dermatol Clin**, v.25, n.3, Jul, p.293-302, vii. 2007.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sci**, v.58, n.18, p.1485-507. 1996.

WILSON, N. S.; VILLADANGOS, J. A. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. **Immunol Cell Biol**, v.82, n.1, Feb, p.91-8. 2004.

WITOWSKI, J. *et al.* IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. **J Immunol**, v.165, n.10, Nov 15, p.5814-21. 2000.

WOOD, J. M. *et al.* Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H₂O₂. **Biochem Biophys Res Commun**, v.325, n.4, Dec 24, p.1412-7. 2004.

XU, A. E. *et al.* Efficacy and safety of tacrolimus cream 0.1% in the treatment of vitiligo. **Int J Dermatol**, v.48, n.1, Jan, p.86-90. 2009.

YAMAUCHI, K. *et al.* Synthesis of quercetin glycosides and their melanogenesis stimulatory activity in B16 melanoma cells. **Bioorg Med Chem**, v.22, n.3, Feb 1, p.937-44. 2014.

YOUNG, L. M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v.26, n.3-4, 1989/03/01, p.335-341. 1989.

ZHANG, X. *et al.* Effects of single herbal drugs on adhesion and migration of melanocytes. **J Tradit Chin Med**, v.25, n.3, Sep, p.219-21. 2005.

ZHOU, L. *et al.* Systemic analyses of immunophenotypes of peripheral T cells in non-segmental vitiligo: implication of defective natural killer T cells. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.25, n.5, Sep, p.602-11. 2012.

ZHU, Y. *et al.* A mouse model of vitiligo induced by monobenzene. **Exp Dermatol**, v.22, n.7, Jul, p.499-501. 2013.