

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MICHELLY DE OLIVEIRA RIBEIRO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FOTOQUIMIOPROTEÇÃO & FOTOTOXICIDADE DO
EXTRATO PADRONIZADO DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* EM MELANÓCITOS.

BRASÍLIA

2018

Michelly de Oliveira Ribeiro

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FOTOQUIMIOPROTEÇÃO & FOTOTOXICIDADE DO
EXTRATO PADRONIZADO DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* EM MELANÓCITOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Borin

Coorientadora: Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo

Brasília

2018

Michelly de Oliveira Ribeiro

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FOTOQUIMIOPROTEÇÃO & FOTOTOXICIDADE DO EXTRATO PADRONIZADO DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* EM MELANÓCITOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ___ de _____ de 2018.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso – Universidade de Brasília

Dra. Cinthia Gabriel Meireles – Ministério da Saúde

Dr. Pedro Góes Mesquita (Suplente) – Sabin Medicina Diagnóstica

À minha amada mãe Regina
Aparecida, por ter enfrentado tantas
lutas em nome dos meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus e todos aqueles, que por amor, olham por mim desde a mais terna infância.

À minha orientadora, Maria de Fátima Borin, por tudo que me ensinou, pelas oportunidades que me deu, pela paciência e compreensão. À minha coorientadora Yris Maria Fonseca-Bazzo pelo apoio e auxílio. À Prof. Dra. Kênnia pela colaboração com este projeto.

Aos amigos do laboratório, Rafael Ferreira, Daniela Gurgel, Laíza Magalhães, Manuel Mera, Simone Batista, Cinthia Gabriel, Adria Barros, Pedro Góes, Hanna Santana, Palloma Soares, Paloma Almeida, pela ajuda na pesquisa, companhia e amizade.

A todos do laboratório de Farmacologia Molecular.

À Wanessa Souza, Prof. Guilherme Gelfuso e ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) pela ajuda com a quantificação de furanocumarinas do extrato que estudei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Projeto Cerrado, pela bolsa de mestrado e apoio financeiro respectivamente.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao meu amado, Cleydson Galindo, por ser sempre meu abrigo e por toda paciência e compreensão. E nosso Hachi, por seu amor incondicional.

À minha mãe, Regina Aparecida e meu padrasto, Elielson Aguiar, por sempre estarem ao meu lado e me ajudarem a chegar até aqui. A meu pai, Geraldo Gomes, e minha madrasta, Wanda Rúbia, pelo apoio e por acreditarem nos meus sonhos. As minhas avós, meu avô, bisavô, tias, tios, primas e primos pelo apoio, ajuda e carinho.

A minha amiga, Rayane Oliveira, pela amizade e por ser minha ouvinte e conselheira durante toda a vida. E à minha amada madrinha Clarisse por ser meu exemplo de vida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) e ao Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT - Rede Pró-Centro-Oeste de Pesquisa e Pós-Graduação) pelo apoio financeiro a este projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

...Não somos mais
Que uma gota de luz...
Paulinho Moska

RESUMO

RIBEIRO, Michelly de Oliveira. Avaliação *in vitro* da fotoquimioproteção & fototoxicidade do extrato padronizado de *Brosimum gaudichaudii* em melanócitos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

A *Brosimum gaudichaudii* é uma planta pertencente à família *Moraceae* encontrada no cerrado brasileiro, e é muito utilizada na medicina popular para o tratamento do vitiligo e outras dermatoses. A atividade biológica desta espécie está associada à presença de furanocumarinas com atividade fotossensibilizante, bergapteno e psoraleno. Existem poucos estudos publicados mostrando a eficácia e segurança no uso desta planta, assim o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade, a ação antioxidante e melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* em melanócitos, para determinar sua segurança e ação biológica. Para isso, foram avaliadas a viabilidade celular, a atividade das enzimas tirosinase, catalase e superóxido dismutase, as espécies reativas de oxigênio intracelular, o nível de glutatona, a quantidade de melanina produzida e a expressão gênica para tirosinase e fator de transcrição relacionado a microftalmia, no cultivo celular. O extrato padronizado de *Brosimum gaudichaudii* não foi considerado tóxico nas concentrações de 1,6 a 50 µg/mL. Mostrou ação na melanogênese aumentando a atividade da enzima tirosinase e o conteúdo de melanina nas células tratadas com 50 µg/mL do extrato e irradiadas com UVA. O tratamento dos melanócitos com o extrato também aumentando a atividade da enzima catalase e a associação do tratamento com a radiação UVA normalizou a atividade da enzima superóxido dismutase, que com o tratamento com extratos e padrões sem irradiação celular mostrou diminuição em relação ao controle. Os resultados sugerem que o uso do extrato de *Brosimum gaudichaudii* parece ser útil como tratamento alternativo para o tratamento do vitiligo.

Palavras-chave: *Brosimum gaudichaudii*, mamacadela, melanogênese, antioxidante, psoraleno, bergapteno, vitiligo.

ABSTRACT

RIBEIRO, Michelly de Oliveira. In vitro evaluation of photochemography & phototoxicity of the standardized extract of *Brosimum gaudichaudii* in melanocytes. Dissertation (Master of Science in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences. University of Brasilia, Brasília, 2018.

Brosimum gaudichaudii is a plant belonging to the family *Moraceae*, found in the Brazilian cerrado, and it is widely used in folk medicine for the treatment of vitiligo and other dermatoses. Its biological activity is associated with the presence of furanocoumarins with photosensitizing activity, bergapten and psoralen. There are few published studies showing the efficacy and safety in the use of this plant, so the objective of this work was to evaluate the toxicity, antioxidant and melanogenic action of *Brosimum gaudichaudii* extract in melanocytes, to determine their safety and biological action. For this, it was evaluated the cellular viability, the activity of the enzymes tyrosinase, catalase and superoxide dismutase, the reactive species of intracellular oxygen, the level of glutathione, the amount of melanin produced and the gene expression for tyrosinase and transcription factor related to microphthalmia, in cell culture. The standard extract of *Brosimum gaudichaudii* was not considered toxic at concentrations of 1,6 a 50 µg/mL. It had action in the melanogenesis increasing the activity of the enzyme tyrosinase and the content of melanin in the cells treated with 50 µg/mL of the extract and irradiated with UVA. The treatment of melanocytes with the extract also increased the activity of the catalase enzyme and the association of the treatment with the UVA radiation normalized the activity of the enzyme superoxide dismutase, which with the treatment with extracts and standards without cellular irradiation showed a decrease in relation to the control. The results suggest that the use of *Brosimum gaudichaudii* extract seems to be useful as an alternative treatment for the treatment of vitiligo.

Keywords: *Brosimum gaudichaudii*, mamacadela, melanogenesis, antioxidant, psoralen, bergapten, vitiligo.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Melanogênese através da via cAMP-PKA-CREB.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Espécies Reativas de Oxigênio.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 3. Folhas e frutos (maduro e verde) de <i>Brosimum gaudichaudii</i>.</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Células de melanoma de camundongo B16F10.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 5 Avaliação da atividade da tirosinase na presença do extrato de <i>B. gaudichaudii</i>.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 6. Ensaio de viabilidade celular em células B16F10.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7. Ensaio de viabilidade celular com e sem irradiação UVA em células B16F10.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Ensaio para determinação da quantidade de melanina produzida pelas células tratadas com o extrato de <i>B. gaudichaudii</i> com os padrões bergapteno e psoraleno e UVA.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 9. Ensaio de avaliação da atividade da enzima tirosinase das células tratadas com extrato da <i>B. gaudichaudii</i>, com padrões bergapteno e psoraleno e com UVA.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 10. Ensaio de avaliação dos níveis de glutathiona reduzida nas células tratadas com extratos da <i>B. gaudichaudii</i>, padrões bergapteno e psoraleno e UVA.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11. Ensaio de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) das células tratadas com extrato de <i>B. gaudichaudii</i>, com padrões bergapteno e psoraleno e com UVA.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12. Ensaio de atividade da enzima catalase das células tratadas com extratos da <i>B. gaudichaudii</i>, com padrões psoraleno e bergapteno e com UVA.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13 Ensaio de determinação de espécies reativas do oxigênio intracelular. ...</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14. Teste de integridade do RNA das amostras. Gel de agarose 1% com bandas referentes as subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15. Expressão relativa do mRNA do gene da tirosinase e do fator de transcrição relacionado a microftalmia (MITF) das células tratadas com extrato de <i>B. gaudichaudii</i>, com os padrões bergapteno e psoraleno e com UVA.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 16. Curva de dissociação (curva de melting) dos produtos de amplificação. .</i>	<i>55</i>

Figura 17 Curva padrão.....56

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Desenho dos primers utilizados no ensaio de RT-qPCR.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 2. Condições para a realização do ensaio de RT-PCRq.</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 3. Quantidade de bergapteno e psoraleno presente no extrato de B. gaudichaudii.</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 4. Teste de pureza do RNA extraído das amostras.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 5. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência.....</i>	<i>56</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
α -MSH	Hormônio estimulante de α melanócitos
ATCH	Hormônio adrenocorticotrófico
B16F10	Linhagem celular de melanoma de camundongo
β -MSH	Hormônio estimulante de β melanócitos
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	Catalase
CREB	Elemento responsivo de ligação ao cAMP
CYP	Citocromo
DCT	Dopacromo tautomerase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPBG	Extrato padronizado de <i>Brosimum gaudichaudii</i>
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
FKBPI2	Imunofilina citoplasmática
GSH	Glutationa
GSK3b	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

IL1 β	Interleucina 1 beta
MC1R	Receptor de melanocortina 1
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MITF	Fator de transcrição relacionado à melanogênese
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NBT	Nitroblue Tetrazolium
OPA	O-ftalaldeído
PBS	Tampão de fosfato sódio 1M, pH 7,4 com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RT-PCR	Reação de transcrição reversa em cadeia de polimerase em tempo real
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TYR	Tirosinase
TYRP-1	Tirosinase relacionada à proteína 1
TYRP-2	Tirosinase relacionada à proteína 2
UFG	Universidade Federal de Goiás
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	1
1.1. Vitiligo.....	1
1.1.1. Melanogênese.....	2
1.1.2. Espécies reativas de oxigênio e o vitiligo	6
1.2. Tratamento.....	7
1.3. <i>Brosimum gaudichaudii</i>	9
1.3.1. Furanocumarinas	12
1.3.2. Usos da <i>Brosimum gaudichaudii</i>	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Padrões de furanocumarinas	16
3.3. Determinação do efeito do extrato na atividade da tirosinase.....	16
3.4. Linhagem celular e cultivo.....	17
3.5. Avaliação da viabilidade celular baseada na atividade mitocondrial	18
3.6. Ensaio de quantificação da melanina produzida pelas células.	19
3.7. Ensaio para determinação da atividade da tirosinase celular	19
3.8. Avaliação dos níveis de GSH nas células.....	20
3.9. Avaliação da atividade da catalase das células	20
3.10. Avaliação da atividade da superóxido dismutase das células.....	21
3.11. Avaliação de ROS intracelular	22
3.12. Quantificação da expressão gênica da tirosinase e fator de transcrição relacionado à melanogênese nos melanócitos tratados com extrato por RT-qPCR	22
3.12.1. Extração do RNA total a partir da cultura de células.....	22
3.12.2. Teste de Pureza do RNA	23
3.12.3. Teste de Integridade do RNA.....	24
3.12.4. Tratamento do RNA extraído com a enzima desoxirribonuclease (DNase) I.....	24
3.12.5. <i>Primers</i>	24
3.12.6. RT-qPCR.	25

3.13. Quantificação de proteínas	26
3.14. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Quantificação de bergapteno e psoraleno presentes no extrato de <i>Brosimum gaudichaudii</i>	27
4.2. Determinação do efeito do extrato na atividade da tirosinase.....	27
4.3. Ensaio de viabilidade celular.....	28
4.4. Quantificação da melanina produzida pelas células	31
4.5. Avaliação da atividade da tirosinase das células	33
4.6. Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas células	35
4.7. Atividade da enzima superóxido dismutase das células	36
4.8. Avaliação da atividade da enzima catalase das células.....	37
4.9. Espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com o extrato de <i>B. gaudichaudii</i>	38
4.10.1. Teste Pureza do RNA	39
4.10.2. Teste de Integridade do RNA.....	40
4.11.3. RT- qPCR.....	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	47
ANEXO I	55
ANEXO II	56

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1. Vitiligo

Vitiligo é uma doença autoimune em que há a destruição dos melanócitos por células de defesa do organismo, culminando na formação de máculas brancas na região afetada, rodeada por pele normal ou hiperpigmentação nas bordas. Assim, a doença é caracterizada por despigmentação irregular da pele, podendo afetar olhos, cabelo e mucosa bucal. Pode ser classificado baseado na região onde aparece as despigmentações em vitiligo não-segmentar, segmentar e indeterminado (Richmond et al. 2013; Faria et al. 2014a).

A classificação da doença se baseia na teoria neural, que determina que regiões de nervos são afetadas, fazendo com que haja liberação de neuropeptídeos, que podem inibir ou destruir os melanócitos. Portanto, se a doença se manifesta no trajeto do nervo em apenas um lado do corpo é denominado de segmentar, e se ela se manifesta dos dois lados do corpo com tendência simétrica é chamada de não segmentar (Ezzedine et al. 2012).

O vitiligo não segmentar é dividido em acrofacial, quando afeta face, cabeça, mãos e pés; mucosa, quando afeta as mucosas oral e genital; generalizado ou comum, quando a doença começa a ter máculas simétricas; universal, quando 80-90% da superfície do corpo é afetada; e misto, vitiligo segmentar e não segmentar. Existem formas da doença que são indeterminadas, por exemplo quando apenas uma mácula é observada e não segue nenhum padrão neural (Faria et al. 2014b).

Esta doença afeta igualmente ambos os sexos podendo se manifestar em qualquer idade, mas a prevalência é na infância (Gianfaldoni et al. 2018b). No Brasil não há dados epidemiológicos atualizados sobre a incidência e prevalência da doença, mas no mundo a prevalência tem sido estimada entre 0,093% a 1,13% da população (Da Cunha et al. 2008; Tarlé et al. 2014).

Quando se trata do vitiligo não se tem conhecimento da causa exata da doença, o que se tem são mecanismos que podem vir a explicar o seu surgimento. A teoria mais aceita é uma combinação de vários fatores que podem culminar no surgimento da doença, que seria um desequilíbrio auto-imune em pacientes que teriam uma

predisposição genética, onde também poderia estar relacionado um quadro de estresse oxidativo e desequilíbrio neuro-humoral (Filho et al. 2015).

O risco de um irmão de uma pessoa com vitiligo desenvolver a doença é de 6%, e se for gêmeo idêntico é de 23%, o que mostra que existe um fator genético associado a essa doença (Medsker et al. 2016).

Algumas doenças autoimunes também parecem estar associadas com a patogênese, como, por exemplo, a doença de Hashimoto, doença de Graves, anemia perniciosa, doença de Addison, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e diabetes mellitus tipo 1 (Spritz and Andersen 2017). Essas doenças autoimunes ocorrem em uma frequência maior em parentes próximos de pessoas com vitiligo, indicando que essas doenças compartilham pelo menos algumas de suas bases genéticas com o vitiligo (Spritz and Andersen 2017).

Os melanócitos de pacientes com vitiligo são mais vulneráveis do que os de uma pessoa saudável. Existem anormalidades em organelas celulares, que podem acarretar na diminuição da capacidade de lidar com estressores, que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio. Assim, o que é observado nestes pacientes são altas concentrações de peróxido de hidrogênio epidérmico e uma diminuição de enzimas importantes, como catalase, para a transformação dessa espécie reativa de oxigênio em moléculas menos danosas ao organismo (Rashighi and Harris 2017).

Fatores ambientais também aparecem sendo desencadeadores dessa doença. Produtos químicos em contato com a pele podem ser absorvidos e competir pela enzima tirosinase, responsável pela formação de melanina, bloqueando a melanogênese (Harris 2016).

1.1.1. Melanogênese

A melanogênese é a via para a formação de melanina, pigmento sintetizado nos melanócitos epidérmicos, que confere cor e proteção à pele, absorve os radicais livres gerados no citoplasma e fotoprotege contra radiação ionizante, como a radiação ultravioleta (Kim et al., 2015; Oh et al., 2017).

Os melanócitos têm sua origem embrionária na crista neural e migram por todo embrião até seu destino final (Mort et al. 2015). Sua forma imatura é conhecida como melanoblasto, em que os melanossomas, que são as organelas onde a melanina é produzida, armazenada e transportada, ainda não têm a enzima tirosinase funcional. Quando os melanoblastos se desenvolvem e passam a ser células pigmentantes, eles ficam localizados na epiderme, derme e bulbo capilar (Kormos et al. 2011). Dependendo da quantidade de melanina produzida os melanossomas podem ser produzidos em tamanho, número e densidades variáveis (Chang, 2012).

A síntese de melanina pode ter como estímulo fatores como a radiação ultravioleta ou outros fatores ambientais e inflamatórios, e como resposta, hormônios fornecem sinais complexos que dão início à melanogênese (Carletti et al. 2014). O hormônio estimulante de α -melanócito (α -MSH), que é um peptídeo derivado da proopiomelanocortina é produzido no queratinócito e liberado em resposta à irradiação UV. Este hormônio estimula a ativação da via cAMP-PKA-CREB (adenosina monofosfato cíclico proteína quinase A-AMPC), que por sua vez aumenta a expressão do mRNA do gene que codifica o fator de transcrição relacionado a microftalmia (MITF) (Singh and Mukhopadhyay 2014).

A cascata da via cAMP-PKA-CREB (Figura 1) é a via principal para a síntese de melanina. Ela tem início quando o α -MSH, ou outros peptídeos como o hormônio estimulante de β -melanócito (β -MSH) ou ainda o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), se liga ao receptor melanocortina 1 (MC1R) na membrana celular, que ativa a adenilato ciclase (AC), produzindo cAMP, que por sua vez ativa a proteína quinase A (PKA), ativando a expressão de MITF através da fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo à cAMP (CREB) (Chang 2012).

A regulação da expressão de MITF pode acontecer por outras duas vias além da via cAMP-PKA-CREB, que são a via de Wnt, que quando ativada regula negativamente a GSK3 β (glicogênio sintetase quinase 3 beta) que desencadeia uma cascata que culmina na regulação positiva de MITF, e a via ERK que quando ativada fosforila MITF na serina 73 e, em seguida, acontece a ubiquitinação e degradação de MITF. Portanto, essa última via regula negativamente o MITF (Niu et al. 2018).

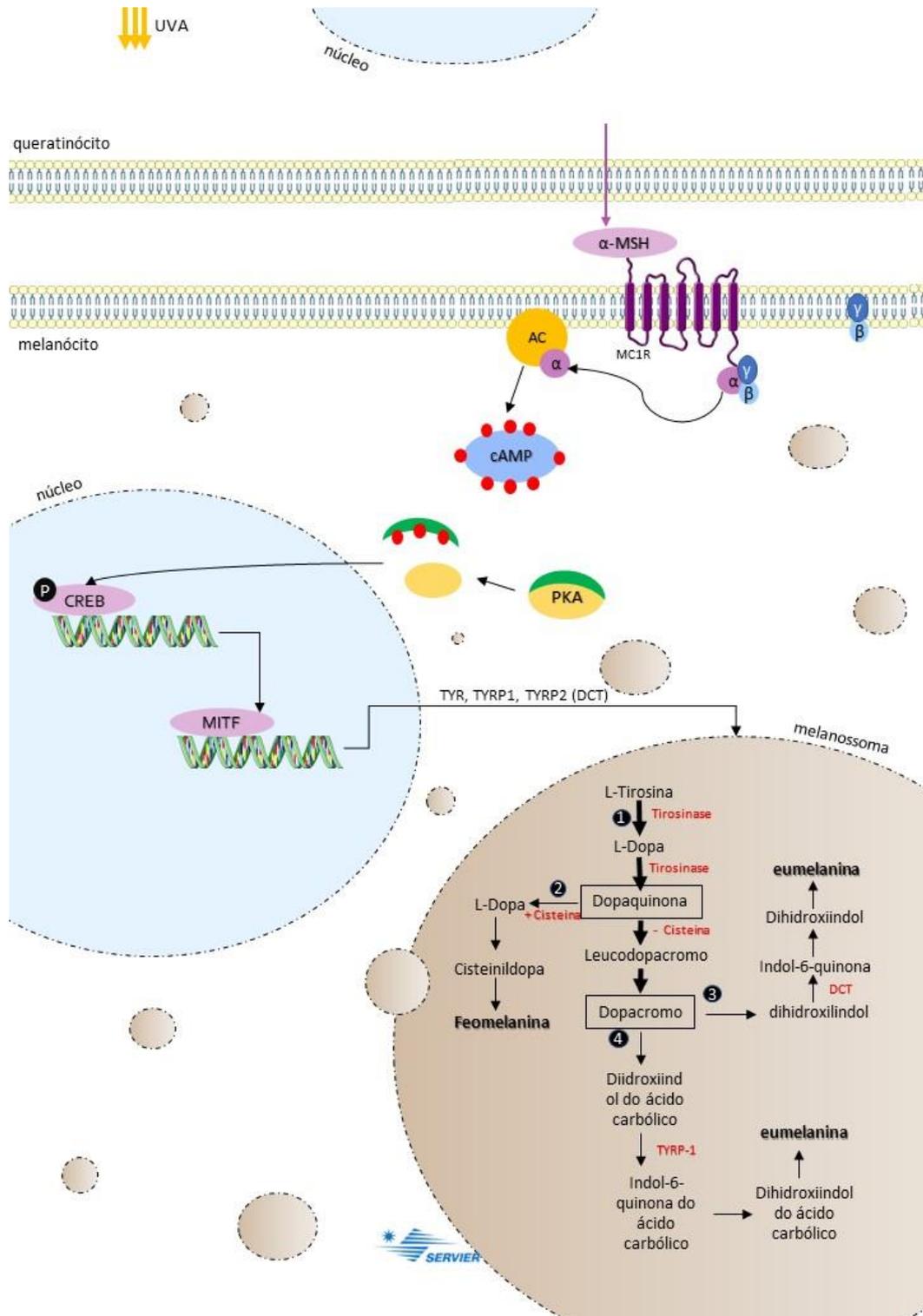


Figura 1. Melanogênese através da via cAMP-PKA-CREB.

Adaptado de Read e colaboradores (2015) e Miot e colaboradores (2009). O hormônio estimulante de α -melanócito (α -MSH) produzido nos queratinócitos em resposta a radiação ultravioleta A (UVA) se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R), ativando a adenilato ciclase (AC). Esta, por sua vez, estimula a produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) que ativa a proteína quinase A (PKA). A expressão do fator de transcrição relacionado à microftalmia é ativada através da fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo à cAMP. MITF é responsável pelo aumento da expressão das enzimas tirosinase (TYR), proteína relacionada a tirosinase 1 (TYRP-1) e proteína relacionada a tirosinase 2 (TYRP2), também conhecida como dopacromo tautomerase (DCT). As enzimas produzidas são responsáveis pela formação das melaninas no melanosomas.

O MITF está relacionado à sobrevivência, proliferação e diferenciação dos melanócitos, pois ele é o principal regulador da melanogênese, agindo sobre a expressão gênica das enzimas que catalisam a síntese de melanina quando se liga à caixa M da região promotora ativando estas enzimas (Chang 2012).

Existem três enzimas que participam da síntese de melanina, elas são tirosinase (TYR), tirosinase relacionada à proteína 1 (TYRP-1) e tirosinase relacionada à proteína 2 (TYRP-2), também conhecida como dopacromo tautomerase (DCT). Entretanto, apenas a TYR é fundamental no processo, pois ela catalisa as reações em que a L-tirosina é hidroxilada e transformada em L-Dopa (L-dihidroxifenilalanina) e, posteriormente, esta é oxidada à dopaquinona (o-quinona). Estas reações são limitantes para a formação da melanina. As demais reações da cascata, após a formação da dopaquinona até a formação da eumelanina ou feomelanina, podem ocorrer espontaneamente em pH fisiológico (Carletti et al. 2014; Alam et al. 2016).

A via melanogênica pode dar origem a dois tipos de melanina, a eumelanina, que tem como característica o pigmento que varia de marrom a preto e é formada quando a dopaquinona, na ausência de cisteína ou glutatona, forma leucodopacromo. A feomelanina, caracterizada por pigmento de coloração amarela a vermelha, formada quando a dopaquinona na presença de cisteína ou glutatona forma a dopa (Miot et al. 2009).

O leucodopacromo pode formar a eumelanina por duas vias distintas, primeiramente ele é convertido a dopacromo e esta molécula pode seguir a via da enzima TYRP-1 e ser transformado em dihidroxiindol do ácido carbólico ou pode seguir a via da DCT e ser convertido em dihidroxilindol (Miot et al. 2009).

A TYR é uma enzima oxidase que possui diversas funções. Ela possui um domínio central de ligação ao cobre contendo resíduos de aminoácidos conservados que incluem três histidinas. Ela é produzida no retículo endoplasmático rugoso, processada no complexo de Golgi e transportada para os melanossomas do melanócito onde a melanina é sintetizada (Chang 2012; Oh et al. 2017).

1.1.2. Espécies reativas de oxigênio e o vitiligo

O organismo se defende do acúmulo de espécies reativas do oxigênio através dos antioxidantes endógenos que podem ser enzimáticos ou não. O sistema enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px). E o não enzimático é composto pela bilirrubina, α -tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, albumina e ácido úrico (Liguori et al. 2018).

É possível adquirir antioxidantes de forma exógena através da alimentação ou por medicação. Os antioxidantes exógenos são ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathiona, resveratrol, ácidos fenólicos, flavonoides, lecitinas de óleo, selênio, zinco e acetilcisteína (Xu et al. 2017; Liguori et al. 2018).

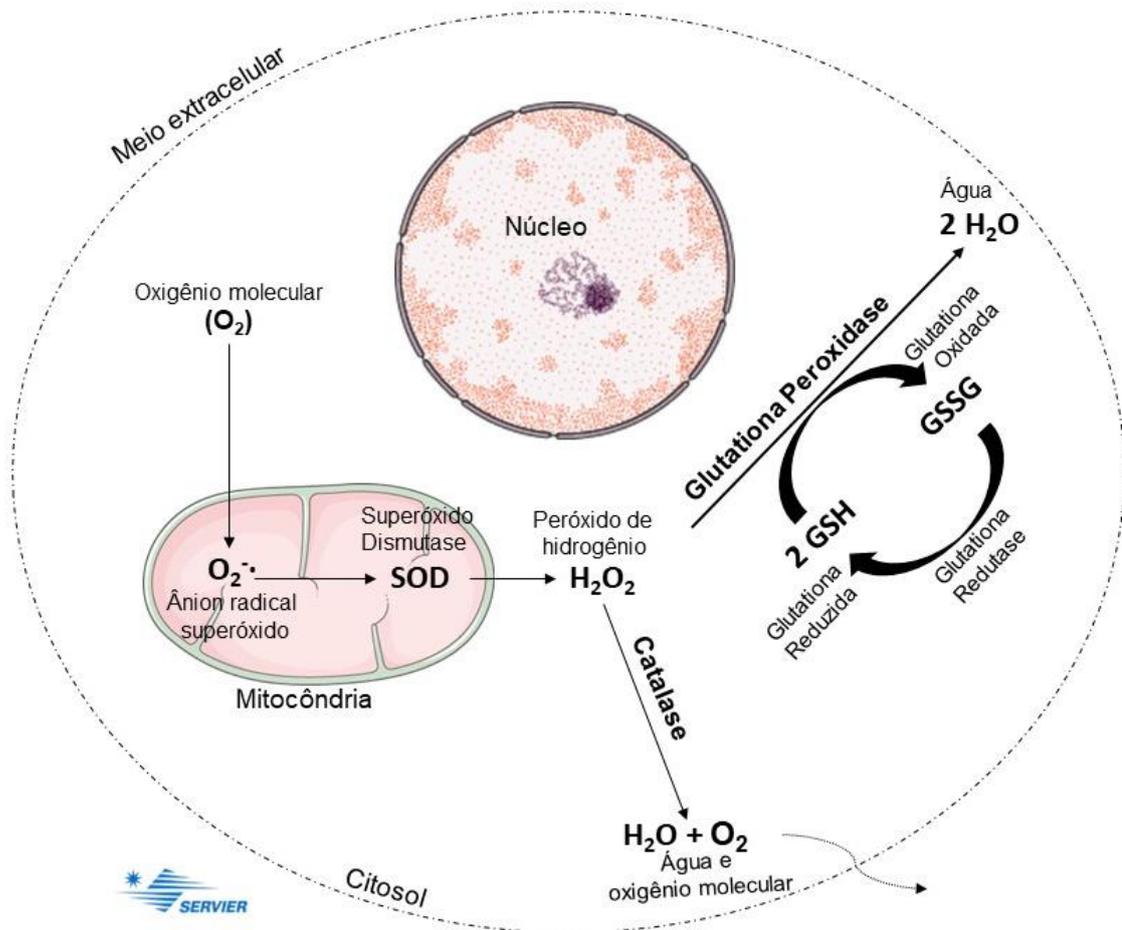


Figura 2. Espécies Reativas de Oxigênio.

Na célula, o oxigênio molecular é transformado a ânion radical superóxido na mitocôndria, que por sua vez é convertido a peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase. O peróxido pode ser transformado em água pela ação da enzima catalase ou pela enzima glutathiona peroxidase.

O ciclo de formação de espécies reativas do oxigênio (Figura 2) começa com a respiração, onde o oxigênio molecular pode ter elétrons adicionados e formar o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). As enzimas SOD (SOD 1 e SOD 2) agem convertendo o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é outra espécie reativa do oxigênio muito prejudicial à saúde, pois ela é muito estável e pode se difundir pelas camadas lipídicas ou aquaporinas intramembranais. Esta espécie reativa é encontrada em níveis altos em pacientes com vitiligo, assim como a SOD (Naini et al. 2012; Di Dalmazi et al. 2016a).

O sistema antioxidante age fazendo com que a enzima catalase transforme o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio, e a enzima glutatona peroxidase o transforma em duas moléculas de água, sendo assim uma defesa antioxidante muito importante para o organismo (Di Dalmazi et al. 2016a). O estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças e o estresse de melanócitos e queratinócitos é um importante mecanismo patogênico na base da progressão do vitiligo (Gianfaldoni et al. 2018b).

1.2. Tratamento

Os tratamentos mais comuns são os que utilizam esteróides tópicos, inibidores de calcineurina, fototerapia e fotoquimioterapia (Filho et al. 2015). A diferença entre a fototerapia e a fotoquimioterapia é que a primeira utiliza somente radiação ultravioleta B (UVB) ou radiação ultravioleta A (UVA) e a segunda utiliza UVA com associação de furanocumarinas.

A fototerapia que utiliza apenas UVA1 (340-400 nm) não é utilizada somente para o vitiligo, mas também para dermatite atópica, psoríase e outras doenças dermatológicas. É uma terapia bem tolerada e seu protocolo de tratamento consiste em 3 a 5 sessões por semana, começando por doses de laser de 20 a 30 J/cm², que aumentam gradualmente com o decorrer do tratamento (Esmat et al. 2017). Para esse tipo de fototerapia existe no mercado equipamentos que permitem tratar pequenas áreas de difícil acesso, como o Laser Alba 355®, que é um equipamento

permite usar uma dose menor em regiões mais focalizadas e as sessões podem ser mais frequentes (Gianfaldoni et al. 2018b).

A fotoquimioterapia mostrou ser mais eficaz, apesar da toxicidade das furanocumarinas, e esse efeito tóxico se deve principalmente ao longo período em que o paciente é exposto ao tratamento para se obter um resultado satisfatório. O uso de UVA e psoraleno é utilizado em tratamentos para outras doenças de pele como, por exemplo, a psoríase e dermatite atópica (MARTINS et al., 2015). Este tratamento de UVA associado com psoraleno consiste na aplicação tópica ou ingestão de furanocumarinas lineares e subsequente exposição à radiação ultravioleta A (UVA) (320–340 nm) (De Moraes et al. 2018).

Um tratamento muito interessante é o de climatoterapia do Mar Morto associado a creme de pseudocatalase. A climatoterapia é explicada por nessa região geográfica o espectro UVB se encontrar atenuado, assim induzindo à repigmentação, e o creme de pseudocatalase fazer com que essa repigmentação seja mais rápida, pois age como antioxidante (Mohammed 2015).

Um dos mais antigos tipos de fototerapia são os Lasers Excimer (308 nm), que são lasers de cloreto de xenônio. Esse tipo de fototerapia está sendo implantada para o tratamento do vitiligo localizado, principalmente na região da face. O paciente faz o tratamento durante 13 semanas e no total o paciente recebe 26 sessões de fototerapia neste período. O paciente começa com uma dose 10% abaixo da dose mínima de eritema na região afetada e a dose vai sendo aumentada gradualmente (Al-Shobaili 2014).

Outra forma de fototerapia é a utilizada pelo dispositivo BIOSKIN EVOLUTION®, que usa uma pequena lâmpada de arco que é filtrada para obter apenas a faixa estreita de UVB. Esse dispositivo é muito flexível, podendo agir em pequenas áreas de difícil acesso, mas trata apenas lesões cutâneas (Gianfaldoni et al. 2018a)

Entre os tratamentos tópicos para vitiligo estão os corticosteróides, que exercem ação de anti-inflamatórios e imunossupressores. Os mais utilizados são creme de dipropionato de betametasona a 0,05% e pomada de propionato de clobetasol a 0,05%. Esses medicamentos têm uma ótima resposta em pacientes com vitiligo inflamatório (Gianfaldoni et al. 2018c). Os corticosteroides podem ser utilizados

também de forma sistêmica em pacientes que têm vitiligo instável. Apesar de serem muito utilizados neste tipo de terapia seu uso é considerado seguro somente quando é feito por um curto período, pois podem surgir vários efeitos indesejados, como por exemplo telangiectasia, hipertricose, taquifilaxia, síndrome de Cushing, retardo do crescimento e outros (Aljebab et al. 2016).

Como alternativa ao uso dos corticosteroides existem os inibidores de calcineurina tópicos, que são imunossuppressores seguros, bem tolerados, mas com preço geralmente pouco acessível. Um dos medicamentos mais utilizados dessa classe é o tacrolimus e ele age ligando-se à imunofilina citoplasmática específica (FKBP12), inibindo a ativação dos linfócitos T, assim não há síntese de interleucinas e outras citocinas (Birlea; Goldstein; Norris, 2017).

Algumas alternativas adicionais estão sendo introduzidos ao tratamento do vitiligo, como, por exemplo, o calcipotriol, que já é utilizado para psoríase e extratos de plantas como o extrato de *Brosimum gaudichaudii*. Combinações de tratamentos são muito utilizadas, tratamentos tópicos associados a fototerapias, calcipotriol com corticosteroides tópicos, entre outras. Cada paciente vai testar várias combinações de tratamento até conseguir um que seja ideal para o seu tipo de vitiligo (Karst and Tibbetts 2016).

1.3. *Brosimum gaudichaudii*

As plantas são fontes de moléculas com propriedades medicinais que são utilizadas como modelo para síntese de diversos fármacos que estão disponíveis no mercado ou que ainda estão sendo estudados (Dutra et al. 2016). O uso medicinal de diversas plantas é testado para o tratamento e prevenção de doenças levando em conta o conhecimento popular. A investigação etnofarmacológica se tornou muito importante para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (Silva et al. 2015).

A família Moreaceae, do grupo das angiospermas, é composta de 40 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies (The Plant List 2013; Schnetzler et al. 2017). No Brasil, estima-se que esta família é representada por aproximadamente 27 gêneros com 250 espécies (Jacomassi et al. 2010). Entre os gêneros desta família destacam-se alguns que têm grande importância na produção de moléculas

biologicamente ativas, como os gêneros *Artocarpus*, *Brosimum*, *Dorstenia*, *Ficus*, *Morus*, entre outros (Schnetzler et al. 2017). Algumas espécies são de importância para a indústria de madeira, papel, borracha e na produção indireta da seda (Jacomassi et al. 2010).

O Brasil é um país rico em biodiversidade, sendo a Amazônia o maior bioma do nosso país. A região que corresponde ao segundo maior bioma é o Cerrado, este é dividido em campo limpo, sujo e cerrado; cerrado propriamente dito e o cerradão. São feitas também algumas inclusões de mata ciliar e seca; veredas ou buritizais e campos rupestres (Lourenço 2001; Silva et al. 2015). Mesmo o cerrado sendo tão vasto ele está entre as regiões do mundo com a biodiversidade mais ameaçada de extinção principalmente pelo crescente aumento das atividades agropecuárias (Sparovek et al. 2015).

Do gênero *Brosimum*, a espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul., é uma planta nativa do Brasil, frequentemente encontrada no cerrado e região nordeste, sendo que esta espécie é a única representante do seu gênero no cerrado brasileiro (Da Cunha et al. 2008; Silva et al. 2011).

Esta espécie sofre constantes agressões, principalmente porque suas raízes são muito utilizadas como medicamento e por estar inserida no cerrado brasileiro, sofrendo com as queimadas constantes e espontâneas que ocorrem neste bioma. Outros fatores prejudiciais são o aumento crescente de desmatamento para plantações agrícolas ou mesmo do aumento das cidades (Faria et al. 2009). Considerando a necessidade de encontrar alternativas para este problema, pesquisas voltadas para germinação, desenvolvimento de plântulas e cultivo têm sido conduzidas (Faria et al. 2009; Silva et al. 2011; Lima et al. 2014).

Esta espécie é popularmente conhecida na medicina popular como mamica de cadela, mamacadela, mamica-de-porco, mamica-de-cachorra e algodão (Da Cunha et al. 2008). *Brosimum gaudichaudii* produz látex em abundância, sendo suas raízes, casca e folhas muito utilizadas na medicina popular. Possui porte arbustivo, podendo tornar-se uma árvore de até 4 m de altura; a árvore adulta é pouco ramificada, enquanto a árvore jovem apresenta um dimorfismo acentuado (Jacomassi et al. 2010).

A folhagem é verde-escura na face superior, folhas são alternadas e simples. Quanto às flores, estas são pequenas e com maior quantidade de flores masculinas, tendo somente um estame de flores femininas. Assim, podem ser observadas inflorescências contendo apenas uma flor pistilada e a sua volta várias flores estaminadas. O ovário tem cinco carpelos, mas apenas um irá se desenvolver virando semente. Macroscopicamente, as inflorescências são muito semelhantes aos frutos que são formados, o que muda é que o fruto terá um formato maior e será mais carnososo (Jacomassi et al. 2010).

Os frutos (Figura 3) têm a superfície com textura rugosa, são leitosos e carnosos, são pequenos, tendo um tamanho que varia de quatro a cinco centímetros, e apresentam coloração que varia entre o amarelo e o laranja, contendo em cada fruto uma ou duas sementes de coloração creme (Pozetti 2005). A melhor época para colheita dos frutos é no período entre setembro e janeiro, mas depende também da região (De Faria et al., 2015).

A raiz é constituída por floema e xilema secundários e periderme, que é um tecido que confere proteção à planta (Jacomassi et al. 2010). Pozetti, em 1969, descobriu que das raízes de *Brosimum gaudichaudii* podia-se extrair duas furanocumarinas e que elas poderiam ser utilizadas no tratamento do vitiligo (Pozetti 1969).



Figura 3. Folhas e frutos (maduro e verde) de *Brosimum gaudichaudii*.

1.3.1. Furanocumarinas

Brosimum gaudichaudii Trécul. é utilizada para o tratamento do vitiligo por conter furanocumarinas com capacidade de promover a fotossensibilização sobre a pele. Essas furanocumarinas são encontradas principalmente nas raízes e na parte inferior da haste desta planta, mas também já foi relatado a presença de bergapteno, uma furanocumarina, nos frutos maduros (Jacomassi et al. 2010). De acordo com o perfil fitoquímico, nas raízes desta planta podemos encontrar psoraleno, bergapteno, xantiletina, luvangetina e gaudichaudina (Leão et al. 2005).

Destas, duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno, são consideradas as principais substâncias responsáveis por esta atividade da planta (Monteiro et al. 2002; Niu et al. 2016).

As furanocumarinas podem ser encontradas em diversas plantas, fungos e bactérias. O que diferencia as furanocumarinas das cumarinas é a condensação do anel furânico com um núcleo cumarínico (Varanda et al. 2002). São conhecidos dois tipos de furanocumarinas e a diferença entre elas é a posição do grupo furânico, sendo que as que possuem o grupo furânico na posição C6-C7 são chamadas de moléculas lineares e as que possuem o grupo furânico na posição C7-C8 são chamadas de angulares. A toxicidade dessas substâncias pode variar de acordo com a sua estrutura química. As moléculas lineares são mais tóxicas que as moléculas angulares. As furanocumarinas produzidas pela família *Moraceae* são moléculas lineares (Dueholm et al. 2015).

As furanocumarinas são compostos que são fotoativados e a faixa de comprimento de onda ultravioleta A (UVA) efetiva para esta fotorreatividade está situada entre 320 e 400 nm, assim como para outras cumarinas (LOURENÇO 2001). Estes compostos não são afetados pela radiação UVB (Martins 2016). Assim, o tratamento com o extrato depende da radiação UVA para resultar no efeito biológico desses metabólitos secundários.

Quando fotoativadas, as furanocumarinas ligam-se covalentemente ao DNA dos melanócitos, atuando na absorção de fótons e excitação de elétrons. Os elétrons excitados se ligam ao oxigênio ou ácidos nucleicos, fazendo com que as

furanocumarinas voltem ao seu estado fundamental, dando origem a espécies altamente reativas (Melough and Chun 2018).

As espécies formadas ficam em estado tripleto excitado e podem fazer ligações covalentes com a timina no DNA, assim mudando a sua estrutura, pois essa base se reposiciona e essa mudança leva ao bloqueio da replicação dessas células. Pode ocorrer absorção de um segundo fóton no anel lactônico e ligação com outra base de timina, gerando uma ligação cruzada no DNA (De Moraes et al. 2018).

Assim a toxicidade atribuída às furanocumarinas é devida à habilidade destes compostos de se ligarem ao DNA, além de outros fatores que estão associados, como a sua alta reatividade e a capacidade de danificar lipídeos, proteínas, RNA e DNA (Lourenço 2001). Além disso, as furanocumarinas podem inibir o citocromo P450 (CYP). As interações entre furanocumarinas e CYP3A4 geram muitos problemas ao ser humano, isto porque P450 representa uma família ampla e diversificada de proteínas humanas e desempenha um papel importante no metabolismo de medicamentos (Guo and Yamazoe 2004; Dugrand-Judek et al. 2015).

As furanocumarinas podem ser obtidas tanto por extração de plantas quanto por síntese química. Mas ambos os processos têm seus lados negativos. Na extração, o rendimento do produto final recuperado é muito baixo, enquanto o processo de síntese tem um preço muito elevado e gera resíduos tóxicos (Martins et al. 2015). A obtenção por extração é a mais viável, mas há uma necessidade de desenvolver métodos para otimizar essa extração.

As furanocumarinas encontradas na *Brosimum gaudichaudii* têm sido usadas internamente e externamente para promover a pigmentação da pele e o bronzeamento (Richmond et al. 2013). Mas quando utilizados em grandes doses por um período longo de tempo, os psoraleno são hepatotóxicos (Leão et al. 2005).

1.3.2. Usos da *Brosimum gaudichaudii*

O fruto da *Brosimum gaudichaudii* é mastigado, pois, devido ao látex presente, ele forma uma goma de sabor adocicado e o pó obtido das raízes é usado como

fragrância, o que se deve ao odor característico das furanocumarinas, principalmente do psoraleno (Da Cunha et al. 2008). O suco da raiz também é utilizado para preparo de formulações, como pomadas e loções com o intuito de promover a pigmentação da pele (De Moraes et al. 2018).

O uso mais popular desta planta é para o tratamento do vitiligo e outras dermatoses, em que a parte da planta que é utilizada é a entrecasca da raiz, e o tratamento é realizado em forma de banhos ou ingestão de chás (Macedo, M.; Ferreira 2004). Essa planta também é utilizada como depurativo do sangue (Faria et al. 2009). Outros usos já relatados são para o tratamento de hepatite, acnes, alergias, fissuras dérmicas, verminoses, infecções em geral, viroses de animais; diurético e calmante (Martins et al. 2015; Silva et al. 2015)

Foi desenvolvido, através do princípio ativo encontrado na parte inferior do tronco e das raízes do *Brosimum gaudichaudii*, um medicamento fitoterápico para o tratamento do vitiligo, com o nome comercial Viticromin®, que atualmente se encontra fora do mercado (Leão et al. 2005).

As formas farmacêuticas desenvolvidas deste medicamento foram comprimido, pomada e loção, sendo que para comprimido a dose recomendada era de 2 a 4 comprimidos por dia, pela manhã, por 6 meses a 1 ano, e exposição gradual à luz solar (5 - 60 minutos) (Da Cunha et al. 2008). O tratamento com pomada e loção era inserido após algumas semanas do início do tratamento oral, assim eles eram tratamentos complementares, que devia ter a precaução de não ultrapassar o limite máximo de exposição solar, para evitar o risco de queimaduras (Leão et al. 2005).

De acordo com o formulário de fitoterápicos, as cápsulas contendo a entrecasca da raiz de *Brosimum gaudichaudii* deve ter 300 mg de extrato obtido por maceração ou percolação por cápsula. Para a maceração recomenda-se usar etanol a 70% com a droga vegetal na proporção 1:5, por um período de quatro semanas, já a percolação deve ser à velocidade de vinte gotas por minuto, por 48 horas. Os extratos obtidos têm que ser analisados para que não tenham mais que 5% de furanocumarinas. O uso deve ser feito por adultos ou crianças com mais de doze anos. O uso por lactantes ou grávidas não é encorajado, já que não existem estudos suficientes que provem a segurança nestes casos (Anvisa, 2017).

Assim, o extrato da entrecasca da raiz de *Brosimum gaudichaudii* já é utilizada como forma alternativa para o tratamento do vitiligo, mas estudos sobre a sua ação biológica e faixa terapêutica segura são escassos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar citotoxicidade e o efeito do extrato de *Brosimum gaudichaudii* associado à radiação UVA na melanogênese em cultura de melanócitos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade de células B16F10 tratadas com extrato de *Brosimum gaudichaudii* submetidas ou não à radiação UVA.
- Avaliar os níveis de GSH nas culturas de células tratadas com extrato e irradiadas com UVA.
- Avaliar a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase nas culturas de células tratadas com extrato e irradiadas com UVA.
- Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular nas culturas de células tratadas com extrato e irradiadas com UVA.
- Avaliar a quantidade de melanina formada nas culturas de células tratadas com extrato e irradiadas com UVA.
- Avaliar a enzima tirosinase nas culturas de células tratadas com extrato e irradiadas com UVA.
- Avaliar a expressão gênica das enzimas tirosinase (TYR) e do fator de transcrição relacionado à melanogênese (MITF) por RT-qPCR.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

Foi utilizado o extrato padronizado de *Brosimum gaudichaudii* fornecido pela Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende da Universidade Federal de Goiás. Para o preparo da solução foram pesados 5 mg do extrato, foi acrescentado 1 mL de metanol grau HPLC (Burdick & Jackson, Michigan, EUA) e colocados no banho-maria com ultrassom (Tecnal, São Paulo, BR) por 30 minutos para que o extrato fosse solubilizado. Posteriormente, o conteúdo foi filtrado para retirar partículas que não foram solubilizadas. O tratamento realizado nas células foi feito com a fração solúvel do extrato de *Brosimum gaudichaudii* e para esse tratamento foram utilizadas várias concentrações resultantes da diluição desta solução.

3.2. Padrões de furanocumarinas

Foram utilizados dois padrões de furanocumarinas, bergapteno e psoraleno $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), que são considerados marcadores químicos do extrato de *Brosimum gaudichaudii* (Pozetti, 1969). Para os ensaios os padrões foram dissolvidos em metanol absoluto grau HPLC. As concentrações dos padrões utilizadas nos ensaios eram equivalentes às quantidades de psoraleno e bergapteno presentes no extrato. Para o cálculo desta relação, o conteúdo das furanocumarinas foi analisado no extrato através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esta análise foi feita pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC/UnB) (Quintão, 2018).

3.3. Determinação do efeito do extrato na atividade da tirosinase

A atividade da tirosinase na presença do extrato foi determinada de acordo com método descrito por Khatib e colaboradores (2005) com algumas modificações. Foi utilizada uma placa de 96 poços, foi feito um branco de reação (controle), três controles positivos e os ensaios com as amostras. O meio reacional foi composto de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, tirosinase 250 U/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e extrato nas concentrações de 3,13 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Foram utilizados três controles positivos, ácido kójico (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), psoraleno (0,5 µg/mL) e bergapteno (1,6 µg/mL). Após 5 minutos a 25°C, 100µL de L-tirosina a 2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foram adicionados e a placa foi incubada por 20 minutos a 25°C, para que a enzima tirosinase convertesse a L-tirosina em L-DOPA e, posteriormente, em dopaquinona, em seguida a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, Califórnia, EUA).

3.4. Linhagem celular e cultivo

As células de melanoma de camundongo da linhagem B16F10, obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10% (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), penicilina G e estreptomicina (100 µg/mL) e incubadas em incubadora (Sanyo, Osaka, JP) com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram subcultivadas a cada 2 dias, usando tampão de fosfato sódio 1M, pH 7,4 com 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl (PBS) para lavá-las e tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) para desagregá-las da placa. As células subcultivadas foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10⁴ células/poço para o ensaio de avaliação da viabilidade celular, atividade da tirosinase e quantificação de melanina. Para os demais ensaios as células foram inoculadas em placa de 6 poços a uma densidade de 3x10⁵ células/poço e os ensaios foram realizados em triplicata.

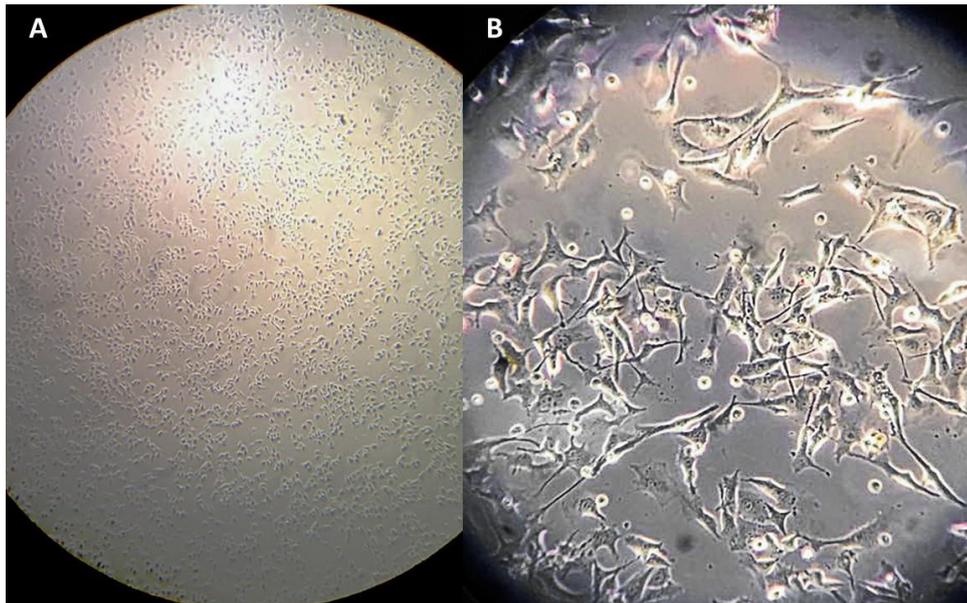


Figura 4. Células de melanoma de camundongo B16F10.

A) Células B16F10 com aumento de 40X. B) Células B16F10 com aumento de 400X.

3.5. Avaliação da viabilidade celular baseada na atividade mitocondrial

O ensaio de citotoxicidade é um ensaio colorimétrico onde é medida a coloração do formazan produzido, mostrando a atividade das desidrogenases mitocondriais ativas. Foi realizado de acordo com o método descrito por Mosmann, 1983.

As células foram semeadas em placa de 96 poços e tratadas por 48 horas. O meio com o tratamento foi substituído por meio DMEM e adicionado, a cada poço, 10 μ L do reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), (5 mg/mL, em PBS) e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C. Após este período, o meio foi aspirado e acrescentou-se 100 μ L de isopropanol acidificado para solubilização do formazan produzido. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm em um leitor de placa DTX 800 Multimode Detector, (Beckman Coulter, Califórnia, EUA).

Para a avaliação da viabilidade das células tratadas e expostas à radiação UVA, as células foram irradiadas com uma dose de UVA de 5 J/cm² após o término do tratamento de 48 horas com o extrato. Após a irradiação as células foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C, por 1 hora antes do acréscimo do MTT.

3.6. Ensaio de quantificação da melanina produzida pelas células.

O ensaio para determinar a quantidade de melanina produzida pelas células foi feito de acordo com Khatib e colaboradores (2005) com algumas modificações. Para esta avaliação, as células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com o extrato. Após 48 horas, foi descartado o meio de cultivo com o tratamento, as células foram lavadas com tampão fosfato-salina e foi adicionado 500 µL de NaOH 1 N em DMSO a 10% em cada poço. A placa foi incubada a 80°C por 30 minutos para que a melanina pudesse ser solubilizada. Ao final deste período de tempo, foi medida a absorbância no espectrofotômetro a 490 nm em um leitor de placas DTX 800 Multimode Detector, (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). Foi utilizado o hormônio estimulador de melanócito alfa (α -MSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) como controle positivo. O ensaio foi repetido para associação do tratamento com o extrato com a irradiação das células com UVA, sendo que a irradiação foi feita ao término do tratamento com extrato e depois de irradiadas as células foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C, por 1 hora antes de prosseguir com o ensaio. O ensaio foi normalizado para proteínas.

3.7. Ensaio para determinação da atividade da tirosinase celular

A atividade da tirosinase das células foi determinada utilizando a metodologia descrita por khatib e colaboradores (2005) com modificações. As células foram semeadas em placa de 96 poços e tratadas com o extrato. Após 48 horas, foi descartado o meio de cultivo com tratamento, as células foram lavadas com PBS e lisadas com 100 µL de tampão contendo 10ml/L Triton® X100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), deixando a enzima tirosinase livre no meio reacional. Após a lise das células, foram adicionados 100 µL de L-tirosina a 2 mM e o meio reacional foi incubado a 25°C por 2 horas, para que a enzima tirosinase convertesse a L-tirosina em L-DOPA e posteriormente em dopaquinona e ao fim da reação em melanina.

A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 492 nm em leitor de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). Foi utilizado o hormônio estimulador de melanócito alfa (α -MSH) (Sigma-Aldrich, St.

Louis, Missouri, EUA) como controle positivo. O ensaio foi repetido para associação do tratamento com o extrato com a irradiação das células com UVA, sendo que a irradiação foi feita ao término do tratamento com extrato e depois de irradiadas as células foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C, por 1 hora antes de prosseguir com o ensaio.

3.8. Avaliação dos níveis de GSH nas células

Os níveis de GSH (glutathiona reduzida) foram determinados utilizando o ensaio de fluorescência previamente descrito por Hissin e Hilf (1976). Para esta avaliação, as células foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas por 48 horas com o extrato e padrões, então foram recolhidas. Adicionou-se água gelada ao *pellet*, submetendo as células a congelamento e descongelamentos sucessivos para causar lise celular. Adicionou-se 14 µL de ácido tricloroacético (TCA) (Acrós Organics/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) a 30%, centrifugando duas vezes a 4000 rpm a 4°C. Para a determinação de GSH foi utilizada uma placa de 96 poços onde foram adicionados, em cada poço, 10 µL de amostra, 180 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 contendo 5 mM de EDTA (Vetec/Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 10µL de solução de o-ftalaldeído (OPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em metanol na concentração de 1 mg/mL.

A fluorescência foi determinada após 15 min em 350 nm e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência DTX 800 Multimode Detector, (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). O ensaio foi repetido para associação do tratamento com o extrato com a irradiação das células com UVA, sendo que a irradiação foi feita ao término do tratamento com extrato e depois de irradiadas as células foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C, por 1 hora antes de prosseguir com o ensaio. O ensaio foi normalizado para proteínas.

3.9. Avaliação da atividade da catalase das células

O ensaio para determinar a atividade da catalase foi realizado de acordo com Aebi (1984). Para esta avaliação, as células foram semeadas em placas de 6 poços, tratadas com extrato e padrões por 48 horas e recolhidas. Adicionou-se tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 ao *pellet*, submetendo as células a congelamentos e

descongelamentos sucessivos para causar lise celular. Para leitura foi preparado um meio reacional contendo 650 μL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; 300 μL de peróxido de hidrogênio 30 mM (Vetec/Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 50 μL de lisado celular. A catalase presente no lisado transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.

O ensaio foi lido em espectrofotômetro no modo cinético, a 240 nm por 2 minutos no DTX 800 Multimode Detector, (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). O ensaio foi repetido para associação do tratamento com o extrato com a irradiação das células com UVA, sendo que a irradiação foi feita ao término do tratamento com extrato e depois de irradiadas as células foram incubadas com 5% de CO_2 a 37°C, por 1 hora antes de prosseguir com o ensaio. O ensaio foi normalizado para proteínas.

3.10. Avaliação da atividade da superóxido dismutase das células

O ensaio para avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi feito de acordo com o método descrito por Robak e Gryglewski (1988), com modificações. Para esta avaliação, as células foram semeadas em placas de 6 poços, tratadas com extrato e padrões, após 48 horas, recolhidas. Adicionou-se tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,8 com 0,1 mM de EDTA ao *pellet*, submetendo as células a congelamentos e descongelamentos sucessivos para causar lise celular. Para o ensaio foi preparada solução contendo 60 μM de *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 100 μM de xantina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 contendo 0,1 mM de EDTA. O meio reacional foi composto de 10 μL do lisado celular, 170 μL da solução de NBT 60 μM e xantina 100 μM e 20 μL da enzima xantina oxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

A leitura foi feita em espectrofotômetro DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, Califórnia, EUA) no modo cinético, a 560 nm por 5 minutos. Neste ensaio a reação da xantina com a xantina oxidase geram o ânion radical superóxido e este reduz o NBT a formazan. A SOD reduz a concentração do ânion radical superóxido, assim diminuindo a redução do NBT (Spitz and Oberley 1989). O ensaio foi repetido para associação do tratamento com o extrato com a irradiação das

células com UVA, sendo que a irradiação foi feita ao término do tratamento com extrato e depois de irradiadas as células foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C, por 1 hora antes de prosseguir com o ensaio. O ensaio foi normalizado para proteínas.

3.11. Avaliação de ROS intracelular

O ensaio para determinar as espécies reativas do oxigênio (ROS) presentes nas células foi realizado de acordo com Sim e colaboradores (2017). Para o ensaio, as células foram semeadas em placa de 96 poços e tratadas com o extrato. Após 48 horas, o tratamento foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Em seguida foram adicionados 100 µL de uma solução de 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (1,949 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em PBS, e a placa foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos para que as espécies reativas de oxigênio presentes na célula pudessem oxidar o reagente DCFH-DA, gerando fluorescência.

A leitura foi feita em espectrofluorímetro, em 485 nm de excitação e 530 nm de emissão no leitor de placas DTX 800 Multimode Detector, (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). O ensaio foi repetido para associação do tratamento com o extrato com a irradiação das células com UVA, sendo que a irradiação foi feita ao término do tratamento com extrato e depois de irradiadas as células foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C, por 1 hora antes de prosseguir com o ensaio. O ensaio foi normalizado para proteínas.

3.12. Quantificação da expressão gênica da tirosinase e fator de transcrição relacionado à melanogênese nos melanócitos tratados com extrato por RT-qPCR

3.12.1. Extração do RNA total a partir da cultura de células

Depois de ser realizado o tratamento com os extratos e padrões, os melanócitos foram submetidos à extração de RNA. Foi removido o meio de cultura das placas e as células foram lavadas com PBS. Com as placas mantidas em banho de gelo, foram adicionados 2 mL do reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, EUA) em cada placa e em seguida as células foram raspadas e recolhidas em microtubos.

A amostra foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foi centrifugada (Sigma, Osterode am Harz, DE) a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Ao final desse processo, o *pellet* foi separado do sobrenadante, que foi transferido para outro microtubo. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Dinâmica, São Paulo, BR) ao sobrenadante, que foi agitado no vórtex por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi, então, centrifugada (14.000 rpm, 20 minutos, 4°C), e ao final ficou nítida a presença de três fases. A fase inferior de coloração vermelha continha DNA, a fase intermediária de coloração branca continha proteína e a fase superior incolor continha o RNA. A fase de interesse, contendo o RNA foi transferida cuidadosamente para outro microtubo. A esta foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto (Dinâmica, São Paulo, BR), o meio reacional foi agitado em vórtex, incubado por 10 minutos e centrifugado (14.000 rpm, 10 minutos, 4°C). Ao *pellet* de RNA obtido adicionou-se 1 mL de etanol (Dinâmica, São Paulo, BR) a 75% gelado, o RNA foi ressuspendido por agitação das amostras em vórtex e foi novamente centrifugado (9.000 rpm, 5 minutos, 4°C).

Após remoção do álcool, os *pellets* foram ressuspendidos em 30-50 µL de água deionizada adicionada de DEPC livre de RNase para dissolução do *pellet*. Depois de dissolvidos os *pellets*, as amostras foram incubadas em banho seco, a 65°C por 10 minutos.

3.12.2. Teste de Pureza do RNA

O teste de pureza do RNA foi realizado por leitura da absorbância em espectrofotômetro do tipo Nano-View Plus (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, EUA) nos comprimentos de onda de 260 nm (para leitura do RNA) e 280 nm (para leitura de proteína) e o cálculo da pureza do RNA foi feito pela razão 260/280.

3.12.3. Teste de Integridade do RNA

O teste de integridade do RNA foi feito por observação das bandas 18S e 28S, que são sub-unidades do RNA ribossômico, por eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio e visualização das bandas, sob luz UV, no transiluminador.

3.12.4. Tratamento do RNA extraído com a enzima desoxirribonuclease (DNase) I

A DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi utilizada para eliminar possíveis contaminações no RNA extraído por DNA genômico. Para cada 1 µg de RNA total foi usado 1 µL de DNase I, 1 µL de tampão de reação DNase I (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, contendo 20 mM MgCl₂ e 500 mM KCl) e água tratada com DEPC.

As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e, decorrido este período, a enzima DNase I foi inativada por meio da adição de 1 µL de tampão de inativação contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA - 50 mM, pH 8,0) seguido de incubação a 70°C, por 10 minutos.

3.12.5. *Primers*.

Para desenhar os *primers forward* e *reverse*, foram utilizadas as sequências da base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Abaixo é mostrada a Tabela 1 com o desenho dos *primers*:

Tabela 1. Desenho dos primers utilizados no ensaio de RT-qPCR.

Gene	Primer	Espécie	Sequência (5' -> 3')
TYR	<i>Foward</i>	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	ACACACTGGAAGTATTTTTGAACA
	<i>Reverse</i>	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	TAGGTGCATTGGCTTCTGGG
MITF	<i>Foward</i>	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	AACAAGGGAACCATTCTCAAGG
	<i>Reverse</i>	<i>Mus musculus</i> (camundongo)	AGATCAGGCGAGCAGAGACC

Os critérios para desenho dos *primers* foram: tamanho (em torno de 20 nucleotídeos), conteúdo de citosina e guanina (50-60%), temperatura de anelamento (aproximadamente 60°C) e tamanho do produto de amplificação (menor que 200 pares de base).

A eficiência relativa e a especificidade dos *primers* foram testadas, para validar a comparação entre o gene de estudo com o gene GAPDH, gene de referência. Para obter essa comparação foi feita uma curva de diluição contendo cinco concentrações diferentes. Depois foi realizado o RT-qPCR, a curva de *melting* resultante foi avaliada para especificidade, e a eficiência foi calculada a partir do coeficiente angular da equação da reta obtida.

3.12.6. RT-qPCR.

Para realização da RT-qPCR foi utilizado o *Kit Power SYBR® Green RNAto-CT 1-Step* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) conforme as instruções do fabricante e o equipamento usado para os ensaios foi o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

O meio reacional foi composto das amostras de RNA extraídas das células, dos *primers*, de oligonucleotídeos, de transcriptase reversa e de *Power SYBR Green*. As condições para a reação de RT-qPCR, na temperatura de anelamento de 60°C, são mostradas na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Condições para a realização do ensaio de RT-PCRq.

Ciclos	Etapas	Temperatura	Tempo
Hold	Reação de transcrição reversa	48°C	30 min (1x)
Hold	Ativação da enzima ampliTaQ DNA polimerase	95°C	10 min (1x)
40 ciclos	Desnaturação	95°C	15 s
	Anelamento e extensão	60°C	1 min
Curva de <i>melting</i>	Desnaturação	95°C	15 s
	Anelamento	60°C	15 s

	Desnaturação	95°C	15 s
--	--------------	------	------

A curva de melting é muito útil para detecção de amplificação inespecífica. Ao final do ensaio foram obtidos os valores de Ct (*Thereshold Cycle*) para cada amostra, utilizado para o cálculo do $\Delta\Delta\text{Ct}$ usado para avaliar a expressão relativa do mRNA do gene de estudo (Livak and Schmittgen 2001).

Foi realizado o ensaio com as amostras sem a presença de RT, para verificar possíveis contaminações na amostra, servindo como mais um controle. Se houver amplificação sem a presença de RT, significa que as amostras de RNA podem estar contaminadas por DNA.

3.13. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi medida pelo ensaio descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.14. Análise estatística

A análise estatística foi feita com auxílio do programa GraphPad Prisma. O teste de variância one-way ANOVA, com pós teste de Dunnett para comparações múltiplas foi usado sempre que pertinente. Diferença estatística foi considerada para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação de bergapteno e psoraleno presentes no extrato de *Brosimum gaudichaudii*

A quantidade de bergapteno e psoraleno foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), realizada pelo laboratório LTMAC/UnB, como padronizado por Quintão, 2018. O extrato analisado estava na concentração de 1 mg/mL, e o resultado do teor de furanocumarinas é mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de bergapteno e psoraleno presente no extrato de *B. gaudichaudii*.

	PSORALENO (µg/mL)	PSORALENO (%)	BERGAPTENO (µg/mL)	BERGAPTENO (%)
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	16,012	1,6	5,47	0,55

O extrato possui um teor maior de psoraleno em relação ao bergapteno de 2,9 vezes. Existem outras plantas usadas para o tratamento do vitiligo que possuem essas furanocumarinas em sua composição como é o caso da *Psoralea corylifolia L.* mostrando que essa classe química pode estar envolvida no efeito benéfico que essas plantas têm para tratar a doença (Wang et al. 2014, 2015; Zhang et al. 2017). Assim, os ensaios realizados para testar a atividade biológica de *Brosimum gaudichaudii* foram realizados também com as furanocumarinas presentes no extrato, em concentrações equivalentes, com intuito de comparação.

4.2. Determinação do efeito do extrato na atividade da tirosinase

O resultado do ensaio realizado para avaliar o efeito do extrato na atividade da tirosinase, principal enzima envolvida no processo de melanogênese, está apresentado na Figura 5. Para efeito de comparação, também foram analisadas as furanocumarinas presentes em 100 µg/mL do extrato em estudo, que são, bergapteno na concentração de 0,5 µg/mL e psoraleno na concentração de 1,6 µg/mL.

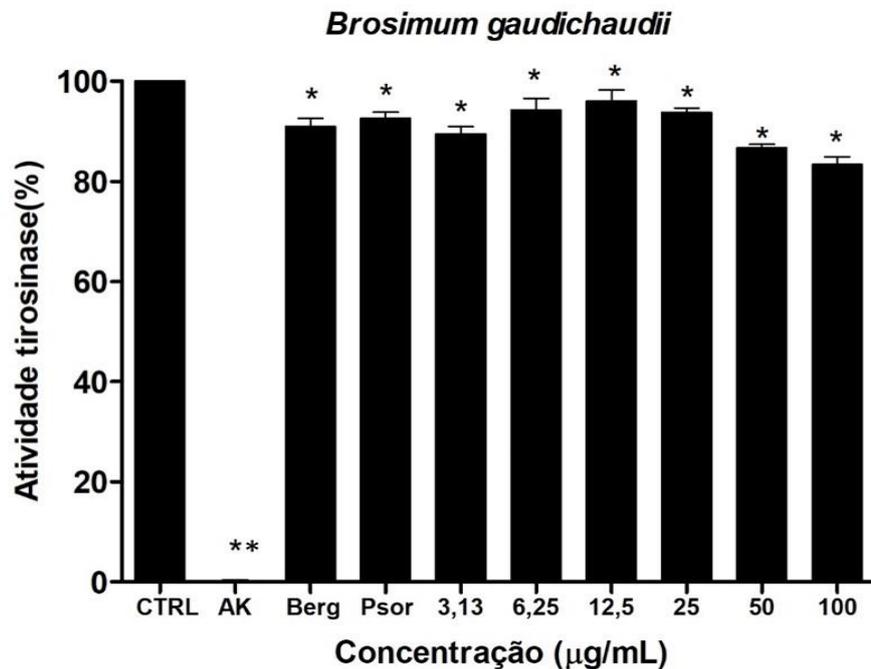


Figura 5 Avaliação da atividade da tirosinase na presença do extrato de *B. gaudichaudii*.

Onde: CTRL, controle; AK, ácido kójico (1000 µg/mL); Berg, Bergapteno (0,5 µg/mL); Psor, Psoraleno (1,6 µg/mL). (*) diferença significativa entre o controle e os extratos ou padrões. $P < 0,05$.

Houve diminuição da atividade da enzima observada para todas as concentrações do extrato e dos padrões utilizados em aproximadamente 10%. O ácido kójico mostrou uma inibição total da atividade da enzima tirosinase.

4.3. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar a toxicidade do extrato padronizado de *Brosimum gaudichaudii* para as células B16F10. Primeiramente, foi realizado um ensaio com uma faixa de concentração mais ampla do extrato, para determinar a faixa de toxicidade e posteriormente, foram escolhidas as concentrações do extrato para novo ensaio e que foi realizado também com irradiação das células com luz UVA. Para este ensaio foram considerados tóxicos os tratamentos que causaram uma diminuição maior que 30% na viabilidade celular.

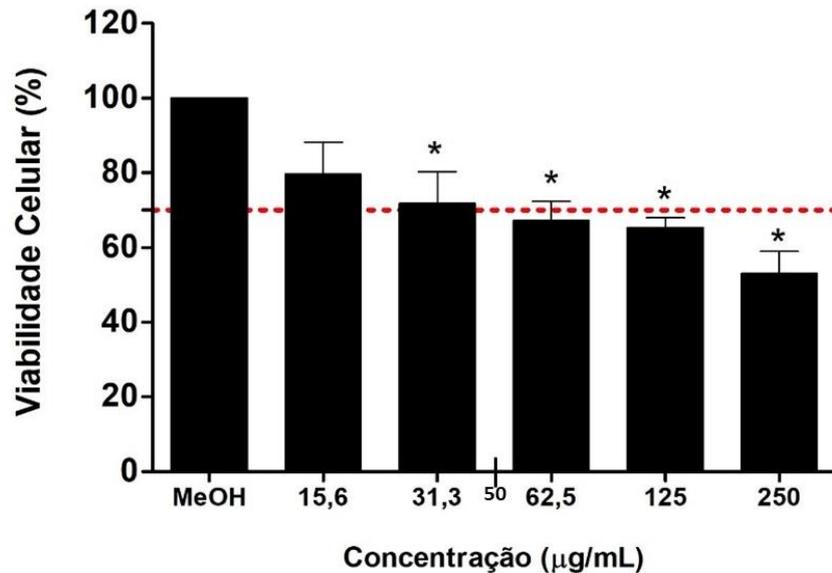


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular em células B16F10.

Ensaio de viabilidade de células tratadas com o extrato de *B. gaudichaudii* nas concentrações de 15,6 a 250 µg/mL. MeOH, controle, células tratadas somente com o veículo usado na dissolução do extrato, metanol.

O ensaio de viabilidade celular mostrou que para concentrações abaixo de 62,5 µg/mL o tratamento com o extrato nas células B16F10 era considerado viável pois a viabilidade celular não diminuiu mais que 30%, limite considerado aceitável. Assim os ensaios foram continuados com a concentração máxima de 50 µg/mL.

Os resultados do ensaio de tratamento das células com o extrato e padrões, mas sem a irradiação com UVA, mostram que ambos, padrões e extrato, não foram tóxicos para as células, uma vez que a viabilidade celular ficou acima de 70% para todos os tratamentos, em relação ao controle. A seguir, o ensaio foi repetido, desta vez com irradiação das células com luz UVA. Os resultados mostram que houve uma diminuição de aproximadamente 10% na viabilidade das células tratadas com o extrato e expostas à radiação UVA em relação aos resultados observados quando as células tratadas com o extrato não foram expostas à radiação UVA, como é mostrado na figura 7. Essa diferença foi maior para os ensaios feitos com os padrões bergapteno e psoraleno. Com a exposição das células à luz UVA as furanocumarinas se mostraram mais tóxicas às células.

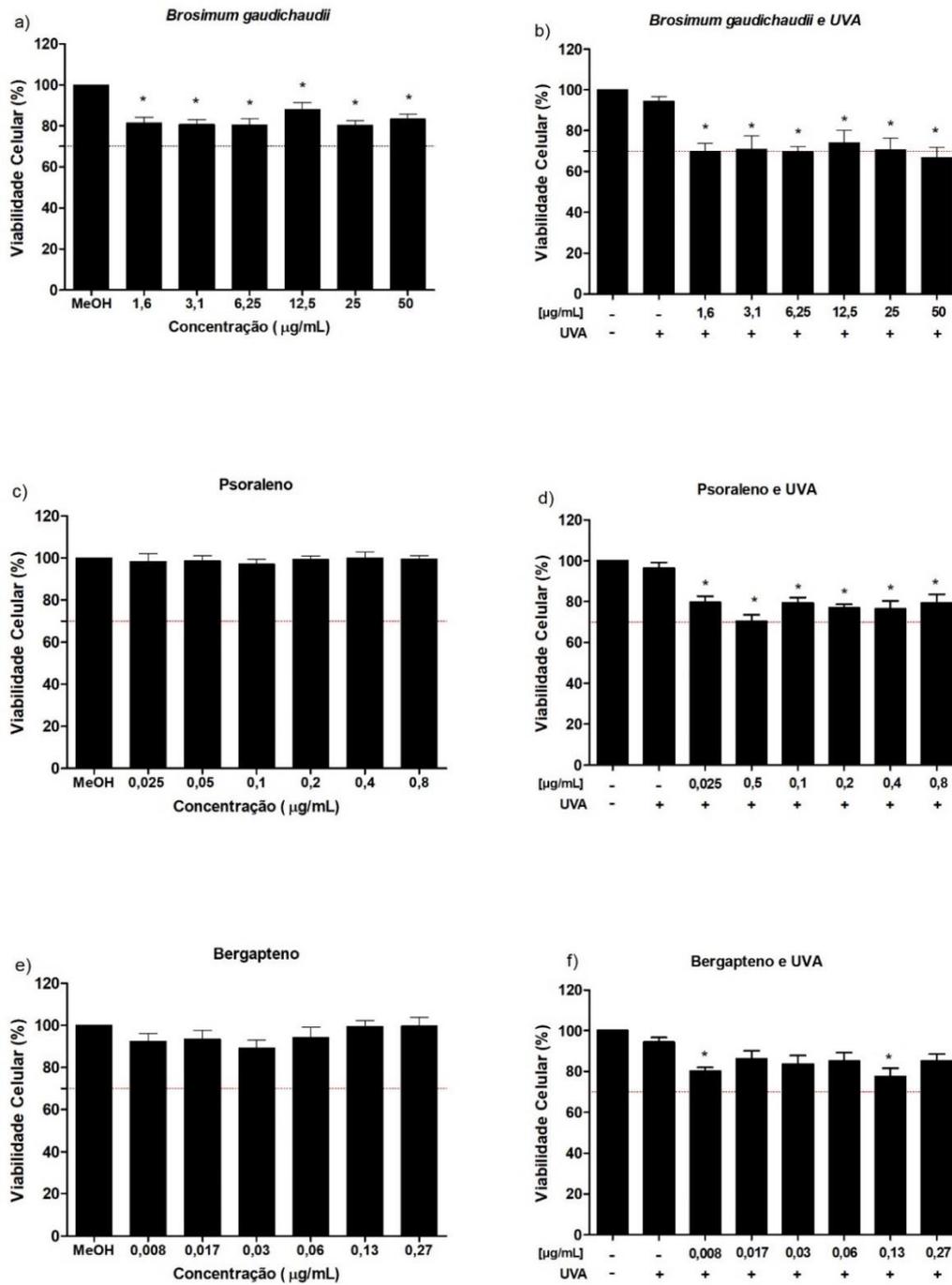


Figura 7. Ensaio de viabilidade celular com e sem irradiação UVA em células B16F10.

A) ensaio de viabilidade celular, sem irradiação, do extrato nas concentrações de 1,6 a 50 µg/mL onde o controle é o veículo, metanol. B) ensaio de viabilidade celular, com irradiação, do extrato nas concentrações de 1,6 a 50 µg/mL onde o controle é o veículo, metanol. C) ensaio de viabilidade celular, sem irradiação, do padrão psoraleno nas concentrações de 0,025 a 0,8 µg/mL, onde o controle é o veículo, metanol. D) ensaio de viabilidade celular, com irradiação, do padrão psoraleno nas concentrações de 0,025 a 0,8 µg/mL, onde o controle é o veículo, metanol. E) ensaio de viabilidade celular, sem irradiação, do padrão bergapteno nas concentrações de 0,008 a 0,27 µg/mL, onde o controle é o veículo, metanol. F) ensaio de viabilidade celular, com irradiação, do padrão bergapteno nas concentrações de 0,008 a 0,27 µg/mL, onde o controle é o veículo, metanol.

(*) diferença significativa entre o controle e os extratos ou padrões. $p < 0,05$.

Foram escolhidas três concentrações dentre as testadas no ensaio de viabilidade celular para dar continuidade aos experimentos; essas concentrações foram 10; 30 e 50 µg/mL para o extrato, 0,16; 0,48 e 0,8 para o psoraleno e 0,05; 0,16 e 0,27 para o bergapteno para os ensaios de tratamento das células sem exposição à luz UVA, e para os ensaios com exposição à radiação UVA foi escolhida uma única concentração, a de 50 µg/mL.

4.4. Quantificação da melanina produzida pelas células

O ensaio para determinar a quantidade de melanina produzida pelas células B16F10 foi realizado para avaliar se o extrato de *B. gaudichaudii* aumentava a síntese de melanina dessas células. O resultado (Figura 8) mostrou que sem a exposição das células tratadas à radiação UVA, o extrato não promoveu um aumento significativo na produção de melanina pelas células comparado ao controle. Somente a concentração de 0,8 µg/mL do psoraleno causou um aumento na produção de melanina pelas células, mas quando o tratamento das células foi feito pela combinação do psoraleno com o bergapteno, para todas as concentrações testadas foram observados aumentos de 100% ou mais na produção de melanina pelas células.

Com a associação do tratamento com a irradiação com UVA, o extrato de *B. gaudichaudii* e o bergapteno promoveram um aumento significativo na produção de melanina.

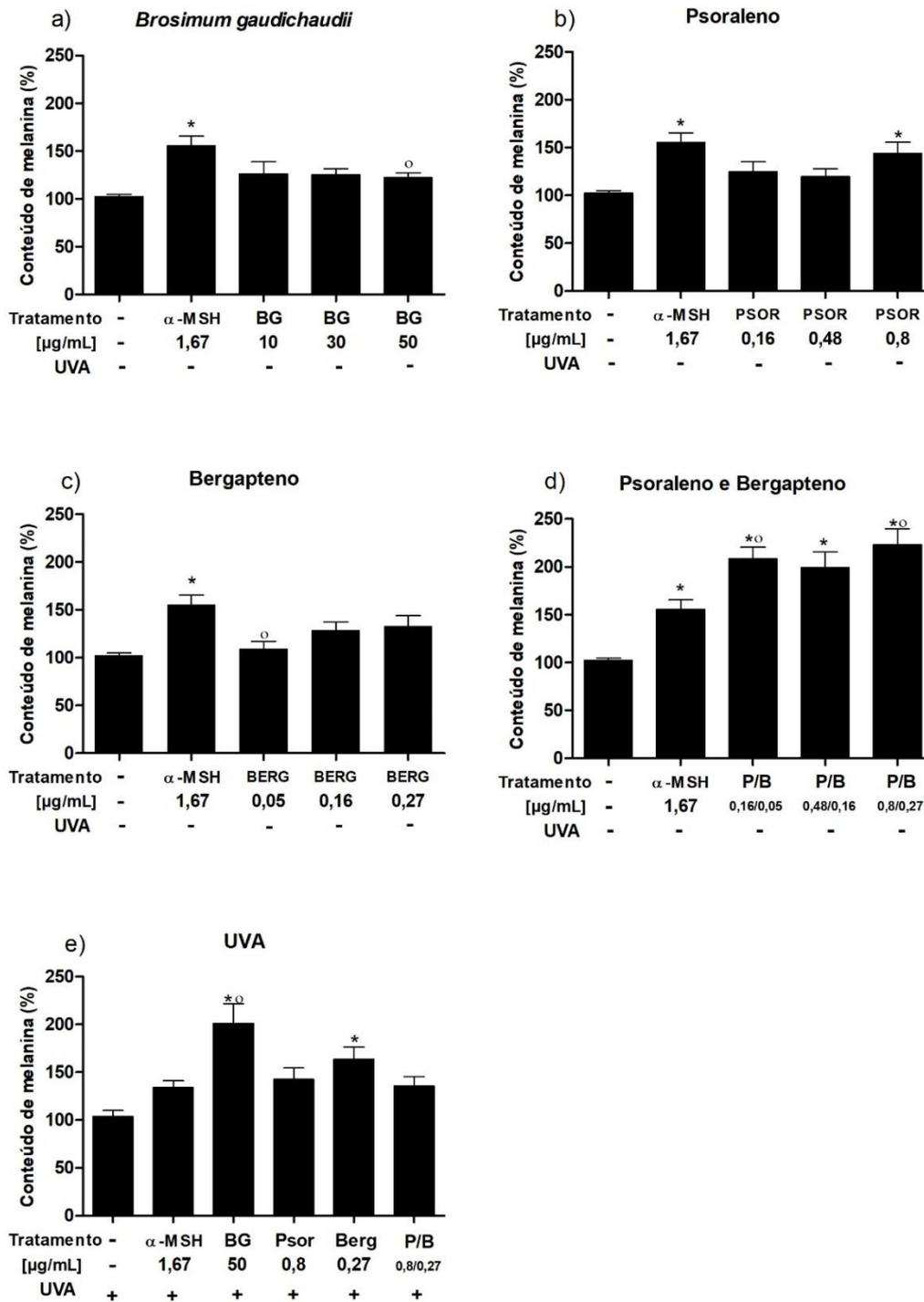


Figura 8. Ensaio para determinação da quantidade de melanina produzida pelas células tratadas com o extrato de *B. gaudichaudii* com os padrões bergapteno e psoraleno e UVA.

A) conteúdo de melanina das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii* nas concentrações de 10,30 e 50 μ g/mL onde o controle são as células tratadas com o veículo, metanol. B) conteúdo de melanina das células tratadas com o padrão psoraleno nas concentrações de 0,16; 0,48 e 0,8 μ g/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. C) conteúdo de melanina das células tratadas com o padrão bergapteno nas concentrações de 0,05;0,16 e 0,27 μ g/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. D) conteúdo de melanina das células tratadas com a combinação dos padrões bergapteno e psoraleno nas concentrações correspondentes à do extrato. E) conteúdo de melanina das células tratadas com o extrato, com os padrões psoraleno, bergapteno e com a combinação dos padrões, e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. O controle em todos os ensaios corresponde ao ensaio feito com as células tratadas somente com o veículo, metanol. α -MSH, α hormônio estimulante de melanócitos; BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno e P/B, combinação de psoraleno com bergapteno.

(*) diferença significativa entre o tratamento e o controle; (°) diferença significativa entre o tratamento e o controle positivo α -MSH. $p < 0,05$.

4.5. Avaliação da atividade da tirosinase das células

Foi realizado anteriormente um ensaio para avaliar se o extrato de *B. gaudichaudii* interferia na atividade da enzima tirosinase (Figura 5) e foi mostrado que houve uma interferência, assim foi realizado um novo ensaio para avaliar a atividade desta enzima nas células tratadas com o extrato e os padrões (Figura 9). Como pode ser observado, não houve diferença significativa na atividade da tirosinase das células tratadas com o extrato de *B. gaudichaudii* em relação ao controle quando as células não foram expostas à luz UVA, somente a combinação dos padrões, psoraleno e bergapteno, causaram um aumento significativo na atividade da tirosinase das células, semelhante ao que foi observado no ensaio de quantificação de melanina. Quando a irradiação com UVA foi associada ao tratamento das células, foi observado um aumento na atividade da enzima das células tratadas com o extrato, da mesma forma que no ensaio de quantificação de melanina.

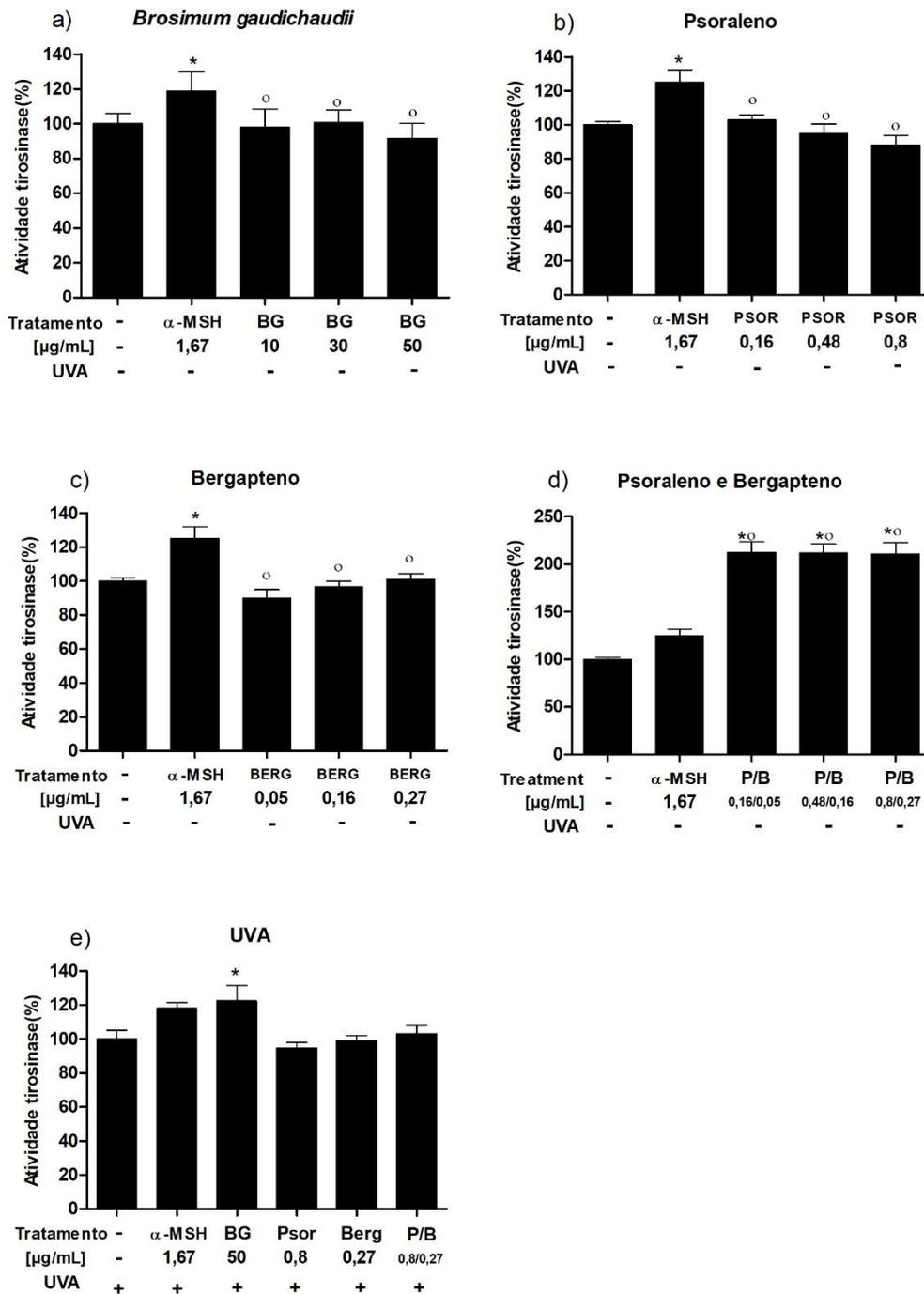


Figura 9. Ensaio de avaliação da atividade da enzima tirosinase das células tratadas com extrato da *B. gaudichaudii*, com padrões bergapteno e psoraleno e com UVA.

A) atividade da tirosinase das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii* nas concentrações de 10,30 e 50 µg/mL. B) atividade da tirosinase das células tratadas com o padrão psoraleno nas concentrações de 0,16; 0,48 e 0,8 µg/mL, correspondentes às do extrato. C) atividade da tirosinase das células tratadas com o padrão bergapteno nas concentrações de 0,05; 0,16 e 0,27 µg/mL, correspondentes às do extrato. D) atividade da tirosinase das células tratadas com a combinação dos padrões nas concentrações correspondentes às do extrato. E) atividade da tirosinase das células tratadas com o extrato, padrões psoraleno, bergapteno e combinação de padrões e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. O controle em todos os ensaios corresponde ao ensaio feito com as células tratadas com o veículo, metanol. α-MSH, α hormônio estimulante de melanócitos, controle positivo; BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno e P/B, combinação de psoraleno com bergapteno.

(*) diferença significativa entre os tratamentos e o controle. (°) diferença significativa entre os tratamentos e o controle positivo, o α-MSH. p < 0,05.

4.6. Avaliação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) nas células

O ensaio mostrado os níveis de glutatona reduzida foi realizado para mostrar a atividade antioxidante do extrato. Como mostrado na Figura 10 o tratamento das células com o extrato de *B. gaudichaudii* causou um aumento significativo nos níveis de glutatona reduzida enquanto o tratamento com os padrões causou uma diminuição dos níveis de glutatona. Quando as células foram tratadas e irradiadas com UVA, o extrato também causou uma diminuição de GSH.

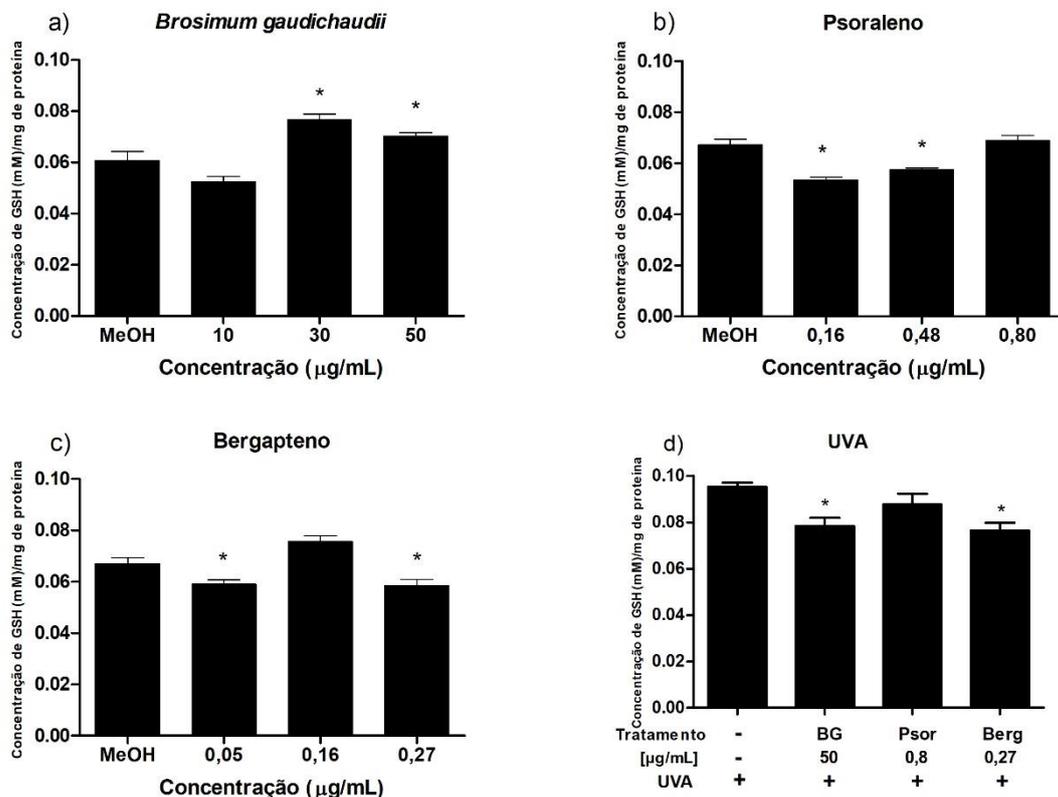


Figura 10. Ensaio de avaliação dos níveis de glutatona reduzida nas células tratadas com extratos da *B. gaudichaudii*, padrões bergapteno e psoraleno e UVA.

A) concentração de GSH das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii* nas concentrações de 10,30 e 50 µg/mL. B) concentração de GSH das células tratadas com o padrão psoraleno nas concentrações de 0,16; 0,48 e 0,8 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. C) concentração de GSH das células tratadas com o padrão bergapteno nas concentrações de 0,05;0,16 e 0,27 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. D) concentração de GSH das células tratadas com o extrato, com os padrões psoraleno, bergapteno e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. O controle em todos os ensaios corresponde ao ensaio feito com as células tratadas somente com o veículo, metanol. BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno.

(*) diferença significativa entre o tratamento e o controle. $p < 0,05$.

4.7. Atividade da enzima superóxido dismutase das células

Em pacientes com vitiligo há uma diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Assim compostos que possam aumentar a atividade da SOD, deixando-a em níveis normais, poderiam trazer um benefício aos pacientes. O resultado do ensaio (Figura 11) mostra que sem irradiação os níveis da enzima caíram drasticamente com os tratamentos com extrato ou padrões, porém com a associação da radiação UVA houve um aumento na atividade da SOD, que foi normalizado.

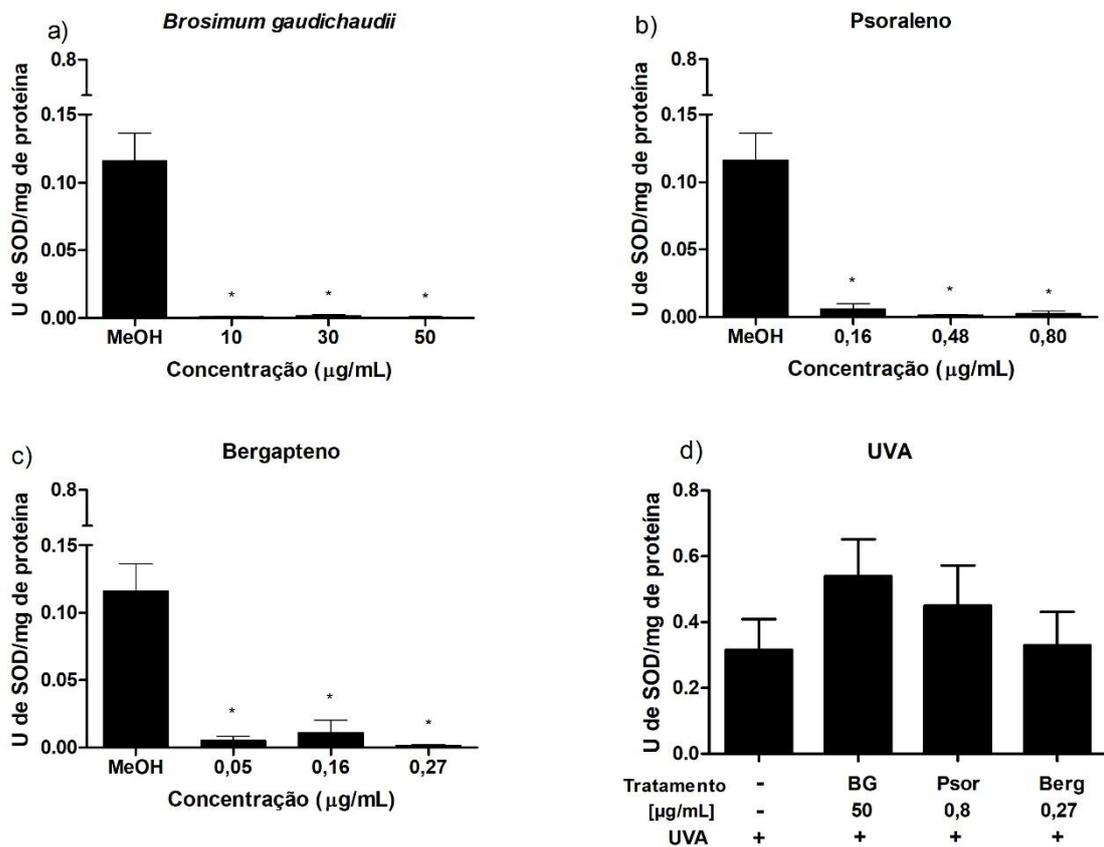


Figura 11. Ensaio de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) das células tratadas com extrato de *B. gaudichaudii*, com padrões bergapteno e psoraleno e com UVA.

A) atividade de SOD das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii* nas concentrações de 10,30 e 50 µg/mL. B) atividade de SOD das células tratadas com o padrão psoraleno nas concentrações de 0,16; 0,48 e 0,8 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. C) atividade de SOD das células tratadas com o padrão bergapteno nas concentrações de 0,05; 0,16 e 0,27 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. D) atividade de SOD das células tratadas com o extrato, com os padrões psoraleno, bergapteno e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. O controle em todos os ensaios corresponde ao ensaio feito com as células tratadas somente com o veículo, metanol. BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno.

(*) diferença significativa entre o tratamento e o controle. $p < 0,05$.

4.8. Avaliação da atividade da enzima catalase das células

Esta enzima catalisa a conversão de duas moléculas de H_2O_2 em oxigênio molecular e duas moléculas de água, e também é uma enzima muito importante do sistema antioxidante. Em pacientes com vitiligo a atividade da catalase normalmente é baixa (Di Dalmazi et al. 2016b), assim tratamentos que possam aumentar a atividade da enzima são benéficos. O resultado da avaliação da atividade da catalase nas células tratadas com o extrato ou os padrões está mostrado na Figura 12.

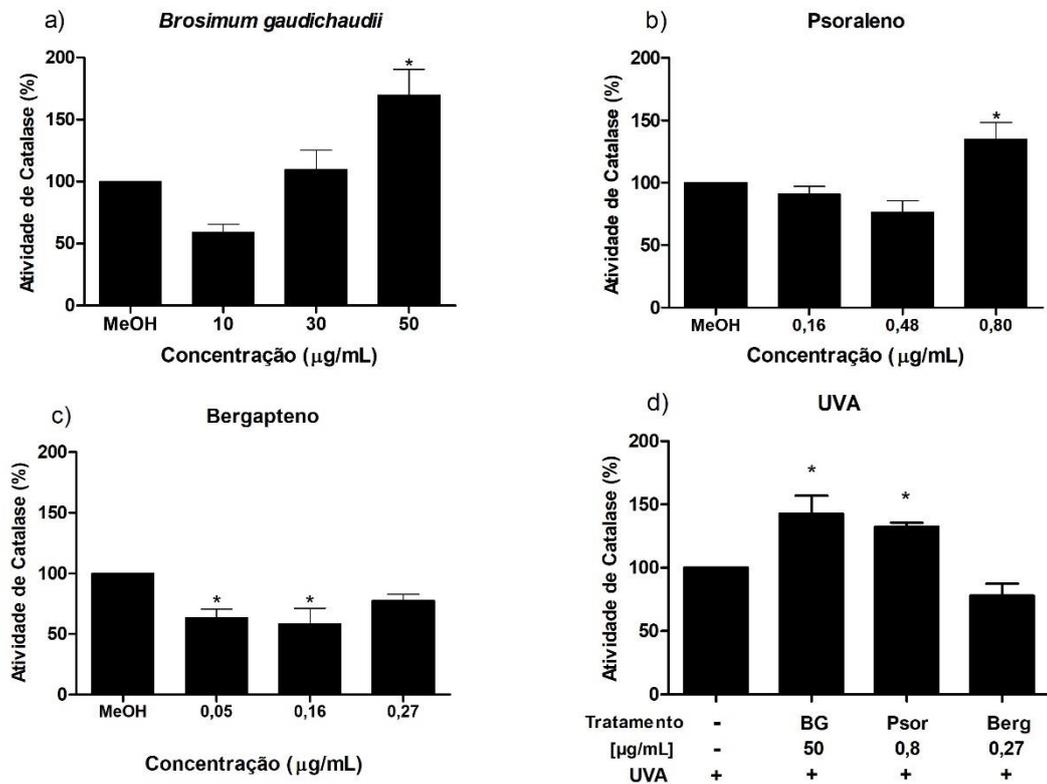


Figura 12. Ensaio de atividade da enzima catalase das células tratadas com extratos da *B. gaudichaudii*, com padrões psoraleno e bergapteno e com UVA.

A) atividade de catalase das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii* nas concentrações de 10,30 e 50 µg/mL. B) atividade de catalase das células tratadas com o padrão psoraleno nas concentrações de 0,16; 0,48 e 0,8 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. C) atividade de catalase das células tratadas com o padrão bergapteno nas concentrações de 0,05;0,16 e 0,27 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. D) atividade de catalase das células tratadas com o extrato, com os padrões psoraleno, bergapteno e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. O controle em todos os ensaios corresponde ao ensaio feito com as células tratadas somente com o veículo, metanol. BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno.

(*) diferença significativa entre o tratamento e o controle. $p < 0,05$.

O resultado mostra que houve um aumento significativo na atividade da catalase das células tratadas com a concentração de 50 µg/mL do extrato e para sua concentração correspondente de psoraleno, tanto sem UVA quanto com a irradiação. Assim, os resultados sugerem que o aumento na atividade da catalase do extrato esteja relacionado à presença do psoraleno no extrato.

4.9. Espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com o extrato de *B. gaudichaudii*.

Para avaliar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nas células com o tratamento com o extrato ou padrões, foi realizado um experimento com fluoresceína, que confere uma coloração fluorescente amarelo-esverdeada quando reage com peróxido de hidrogênio no interior das células. Esperava-se que o extrato diminuísse a quantidade das espécies reativas de oxigênio nas células. Porém o extrato não causou uma diminuição significativa dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares (Figura 13). O padrão bergapteno, nas concentrações de 0,05 e 0,16 µg/mL, causou uma diminuição das espécies reativas de oxigênio nas células, e o psoraleno na concentração de 0,16 µg/mL causou uma diminuição de ROS intracelular e, na concentração de 0,8 µg/mL promoveu um aumento de ROS. Quando a irradiação com UVA foi associada ao tratamento das células, não foram observadas diferenças nas concentrações de ROS intracelular.

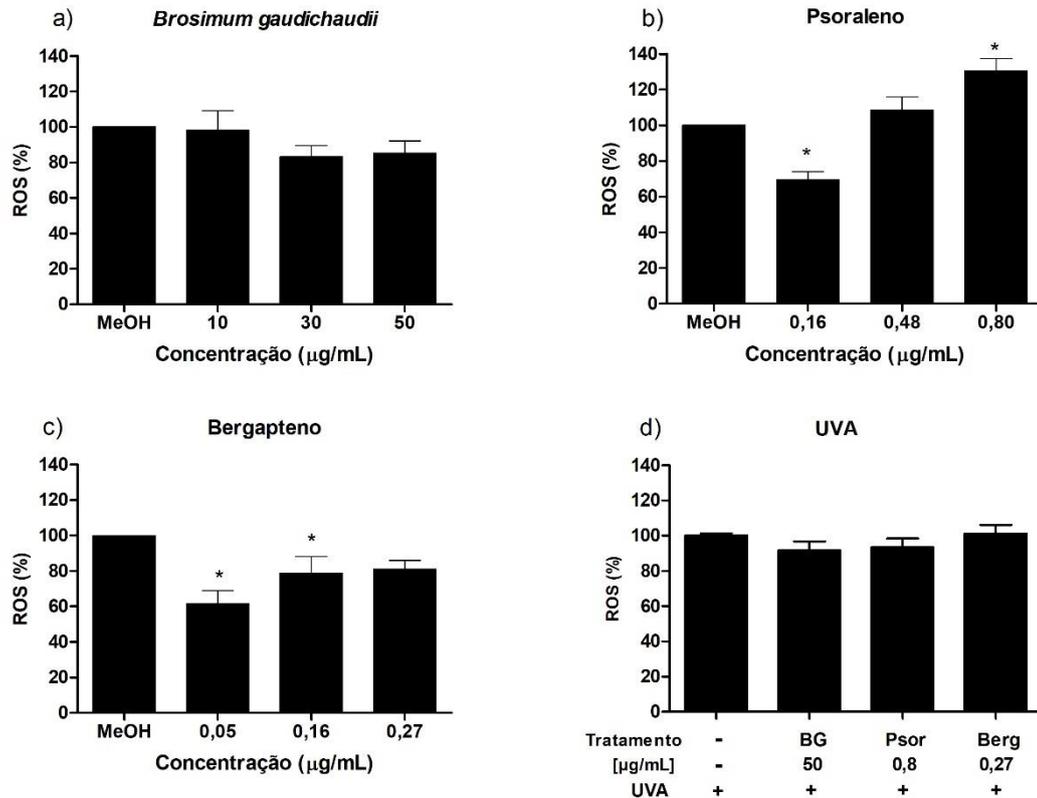


Figura 13 Ensaio de determinação de espécies reativas do oxigênio intracelular.

A) espécies reativas do oxigênio intracelular das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii* nas concentrações de 10,30 e 50 µg/mL. B) espécies reativas do oxigênio intracelular das células tratadas com o padrão psoraleno nas concentrações de 0,16; 0,48 e 0,8 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. C) espécies reativas do oxigênio intracelular das células tratadas com o padrão bergapteno nas concentrações de 0,05;0,16 e 0,27 µg/mL, que correspondem à concentração do padrão no extrato. D) espécies reativas do oxigênio intracelular das células tratadas com o extrato, com os padrões psoraleno, bergapteno e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. O controle em todos os ensaios corresponde ao ensaio feito com as células tratadas somente com o veículo, metanol. BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno.

(*) diferença significativa entre o tratamento e o controle. $p < 0,05$.

4.10. Quantificação da expressão de Tirosinase (TYR) e Fator de Transcrição Relacionado a Melanogênese (MITF) nos melanócitos tratados com extrato *B. gaudichaudii* por RT-qPCR.

4.10.1. Teste Pureza do RNA

Para que o RNA extraído seja considerado puro, a razão das leituras das absorbâncias em 260 e 280 nm deve estar na faixa de 1,7 a 2,0. Os resultados obtidos ficaram dentro da faixa considerada aceitável, assim o RNA extraído foi considerado puro. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Teste de pureza do RNA extraído das amostras.

Amostra	Razão A_{260}/A_{280}		
	N1	N2	N3
DMEM c/UVA	1,956	1,974	1,909
Extrato de <i>B.gaudichaudii</i> - 50 µg/mL c/UVA	1,95	1,98	1,882
Psoraleno 0,8 µg/mL c/UVA	1,971	1,972	1,957
Bergapteno 0,27 µg/mL c/UVA	1,893	1,979	1,88

4.10.2. Teste de Integridade do RNA

O teste de integridade de RNA foi feito por avaliação das bandas referentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico por eletroforese. Como mostrado na Figura 14, todas as bandas das amostras testadas foram visualizadas, assim conclui-se que o RNA estava íntegro.

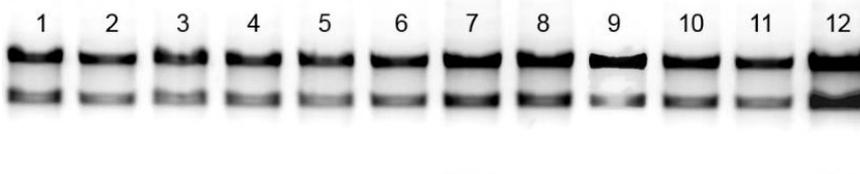


Figura 14. Teste de integridade do RNA das amostras. Gel de agarose 1% com bandas referentes as subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico.

1,5 e 9 são as amostras de células tratadas somente com o metanol e irradiadas com UVA (controle). 2,6 e 10 são as amostras das células tratadas com extrato irradiadas com UVA. 3, 7 e 11 são as amostras das células tratadas com psoraleno irradiadas com UVA. 4, 8 e 12 são as amostras das células tratadas com bergapteno irradiadas com UVA.

4.11.3. RT- qPCR

Não foi observada diferença significativa na expressão gênica de tirosinase e MITF nas células tratadas (Figura 15), quando comparadas com o controle.

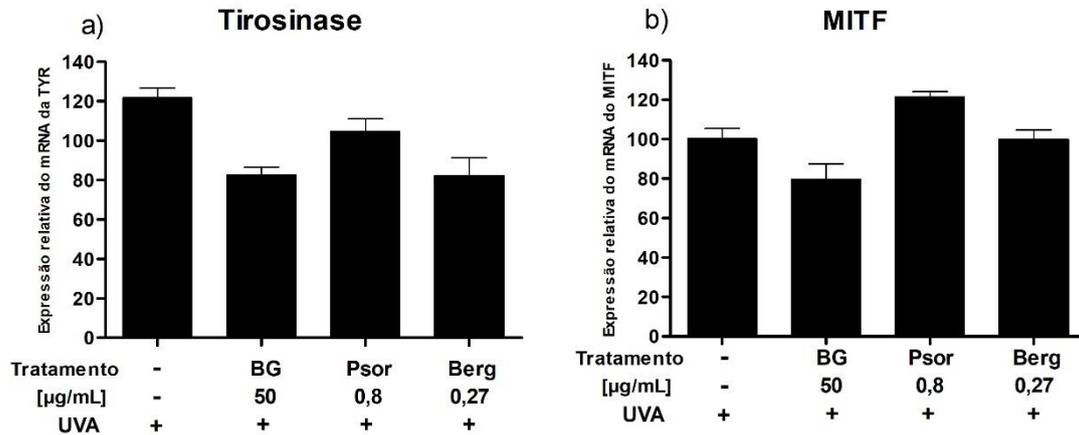


Figura 15. Expressão relativa do mRNA do gene da tirosinase e do fator de transcrição relacionado a microftalmia (MITF) das células tratadas com extrato de *B. gaudichaudii*, com os padrões bergapteno e psoraleno e com UVA.

A) expressão relativa do mRNA do gene da tirosinase das células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii*, psoraleno e bergapteno e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. B) expressão relativa do mRNA do gene do MITF nas células tratadas com o extrato de *Brosimum gaudichaudii*, psoraleno e bergapteno e irradiadas com 5 Jcm⁻² de UVA. Controle, células tratadas somente com o veículo, metanol. BG, *Brosimum gaudichaudii*; Psor, psoraleno; Berg, bergapteno.

(*) diferença significativa entre os tratamentos e o controle. $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O vitiligo é uma doença que tem um efeito negativo na autoestima, diminuindo muito a qualidade de vida e socialização de pessoas que apresentam a doença (Eleftheriadou et al. 2011). Vários estudos mostram a necessidade que os portadores de vitiligo têm de esconder a doença e a dificuldade de lidar com os impactos psicossociais. Muitos julgam que a sua condição é vista como puramente cosmética ou irrelevantes quando comparadas com outras doenças (Teasdale et al. 2018).

O tratamento eficaz para o vitiligo tem sido um grande desafio principalmente por não ter a sua causa bem definida (Filho et al., 2015; Leão et al., 2005). Poucas foram as descobertas de novos medicamentos que fossem eficazes para o tratamento da doença e muitos pacientes se sentem abandonados, sem ter um tratamento que surta algum efeito, principalmente nos casos mais graves da doença (Teasdale et al. 2018).

Com as buscas de novos medicamentos e de alternativas com menos efeitos adversos para o tratamento do vitiligo, as buscas por produtos naturais são essenciais para tentar encontrar novos agentes reguladores da melanogênese e antioxidantes. A procura é pela cura, mas qualquer alternativa de associação com outros medicamentos, para tentar conter a progressão da doença e quem sabe promover a repigmentação da pele lesionada, é bem-vinda para pacientes que não tiveram êxito em nenhum tratamento (Silva et al. 2015).

Como a espécie *Brosimum gaudichaudii* já é descrita para tratar dermatoses, a investigação da sua atividade biológica é muito importante para garantir segurança, comprovar a eficiência e descobrir o mecanismo de ação que gera os resultados já relatados (Jacomassi et al. 2007; Martins et al. 2015; Silva et al. 2015).

Para a investigação da atividade biológica desta planta foi realizado tratamento com o extrato da entrecasca da raiz da *Brosimum gaudichaudii* em células de melanoma de camundongo, B16F10. Essas células foram utilizadas pois possuem mecanismos melanogênicos parecidos com melanócitos humanos normais (Chang 2012).

Os ensaios foram realizados comparando o extrato com as furanocumarinas isoladas na mesma concentração encontrada no extrato. Essas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno, já são conhecidas por sua atividade fotossensibilizante (Monteiro et al. 2002; De Moraes et al. 2018).

No ensaio de viabilidade celular (Figura 7) foi observado que o extrato causou uma diminuição na viabilidade das células em relação aos padrões, mas a viabilidade celular ficou dentro da faixa de 70% considerada aceitável para a continuação dos experimentos.

No ensaio de avaliação da atividade da tirosinase na presença do extrato (Figura 5), houve uma diminuição da atividade da enzima na presença do extrato. Já quando foi realizado o ensaio em cultivo celular (Figura 9) essa diminuição não foi observada e sim um aumento da enzima tirosinase de células tratadas com o extrato e irradiadas com UVA, assim havendo um contraste entre os dois ensaios. Esse resultado não era esperado, pois a planta já é conhecida por ser utilizada para o tratamento do vitiligo, então o resultado esperado era que o extrato da planta não interferisse negativamente na atividade da enzima ou que houvesse um aumento da atividade da enzima que é responsável pela melanogênese nos dois ensaios.

Este resultado pode ser explicado pelo fato da tirosinase usada no ensaio ter sido obtida a partir do cogumelo de *Agaricus bisporus*, que é facilmente encontrada comercialmente, mas apresenta diferenças significativas da tirosinase de mamíferos. A tirosinase de cogumelo é uma enzima do citosol, do tipo tetrâmero e a tirosinase humana é uma enzima ligada à membrana, tipo monômero altamente glicosilado (Chang 2012).

Sendo assim é esperado que nem sempre as respostas em ensaios utilizando esses dois tipos de enzimas sejam parecidos. Já foi mostrado que o ácido p-cumárico, um metabólito secundário de algumas plantas, é um excelente inibidor de tirosinase de mamíferos, mas não é um bom inibidor de tirosinase de cogumelo. A quercetina, um flavonoide natural, é outro exemplo, pois ela é um potente inibidor de tirosinase de cogumelos e aumenta a atividade e síntese de tirosinase de mamíferos (Chang 2012).

Já é conhecido que a produção de melanina confere cor e proteção à pele, absorve os radicais livres gerados no citoplasma e fotoprotege contra radiação ionizante, como a radiação ultravioleta (UV) (Chang 2012; Carletti et al. 2014; Kim et al. 2015; Oh et al. 2017). Assim, a radiação UV foi utilizada, por aumentar a síntese de melanina e por estar associada ao tratamento do vitiligo com psoraleno (Brenner and Hearing 2008; Filho et al. 2015; D'Mello et al. 2016).

Em um estudo realizado por Doppalapudi, Mahira e Khan (2017) mostrou que o psoraleno aumenta a produção de melanina em relação ao controle, metanol, e que não causou diferença significativa na atividade da tirosinase das células tratadas com concentrações de 0,19 a 9,3 mg/mL de psoraleno (Doppalapudi et al. 2017). Os resultados são semelhantes aos resultados obtidos para a produção de melanina e atividade de tirosinase das células tratadas com o psoraleno encontrados neste trabalho (Figuras 8 e 9).

O tratamento dos melanócitos com extrato de *B.gaudichaudii* conseguiu aumentar a produção de melanina nas células, mostrando que ele age como agente pigmentador da pele, e a associação do tratamento com a radiação UVA potencializou esse efeito.

Foi observado também um aumento de melanina nas células tratadas com bergapteno e irradiadas com UVA, sugerindo que parte do aumento da melanina causado pelo extrato se deve à presença desse composto que já é conhecido há vários anos por sua propriedade fotossensibilizante sobre a pele, aumentando a produção de melanina e atividade da tirosinase (Mengeaud and Ortonne 1996).

A enzima tirosinase teve um aumento discreto de sua atividade quando as células foram irradiadas com UVA, porém não houve aumento da sua expressão gênica. Provavelmente, esse aumento da atividade da tirosinase é responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da concentração de melanina. Foi observado no ensaio de quantificação de melanina em que as células foram irradiadas com UVA que houve um aumento de melanina com os tratamentos das células com extrato e bergapteno. Essas mesmas condições de ensaio causaram uma diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) das células (Figura 10).

GSH faz parte do sistema antioxidante das células, em que a glutathione peroxidase é uma enzima que usa glutathione como agente redutor para converter H_2O_2 em água. Assim, a glutathione peroxidase oxida a GSH em glutathione oxidada (GSSG) e esta é posteriormente reduzida a GSH pela enzima glutathione redutase (Pastore et al. 2003; Di Dalmazi et al. 2016a).

Das enzimas antioxidantes estudadas a SOD se encontra em níveis reduzidos nas células tratadas com extrato ou padrões e não expostas à luz UVA (Figura 11), o que pode gerar um acúmulo do ânion radical superóxido nas células, pois essa enzima é uma das vias para sua transformação em H_2O_2 ; a outra via seria a desmutação espontânea pela adição de 1 elétron e 2 prótons (Di Dalmazi et al. 2016a). Como em pacientes com vitiligo ocorre um aumento da SOD (Naini et al. 2012), o ideal seria que a enzima tivesse a sua atividade normalizada, o que foi possível quando as células tratadas foram irradiadas com UVA.

Com o aumento de superóxido dismutase em pacientes com vitiligo é observado um alto nível de H_2O_2 , mas o nível de catalase e a sua atividade geralmente estão diminuídos (Naini et al. 2012). Os níveis de H_2O_2 observados para as células tratadas com extrato, no ensaio de avaliação de ROS intracelular (Figura 13), não mostraram diferença significativa, mas as células tratadas com os padrões bergapteno e psoraleno nas menores concentrações, sem UVA, tiveram diminuição de ROS intracelular.

O resultado da atividade da catalase das células tratadas como extrato é muito significativo (Figura 12), pois o tratamento com a maior concentração do extrato apresentou um aumento da atividade da enzima, tanto na presença de UVA como na ausência. Como psoraleno também causou aumentos parecidos com o do extrato na atividade da catalase das células, pode-se sugerir esse composto como possível responsável por essa atividade.

A enzima catalase tem papel de transformar H_2O_2 em água e oxigênio molecular, e é muito importante para restabelecer o equilíbrio da defesa antioxidante do organismo. Já existe no mercado a pseudocatalase, que é utilizada como tratamento para essa dermatose, mas o extrato de *Brosimum gaudichaudii* parece ser bastante útil para esse tratamento também.

6. CONCLUSÃO

O extrato da entrecasca da raiz da *Brosimum gaudichaudii* vem sendo utilizado como fitoterápico para tratamento de vitiligo. Os resultados deste estudo mostram que, apesar de ter em sua composição furanocumarinas que são conhecidas por sua toxicidade, o extrato nas concentrações estudadas não se mostrou tóxico para as células B16F10.

Os resultados sugerem que o extrato aumentou a atividade melanogênica das células, evidenciada pelo aumento de produção de melanina, e que esse aumento se deve, pelo menos em parte, ao aumento da atividade da enzima tirosinase. Os resultados obtidos sugerem também uma atividade antioxidante do extrato, pelo aumento significativo na atividade da catalase.

As furanocumarinas, bergapteno e psoraleno, parecem estar relacionadas às atividades biológicas de *Brosimum gaudichaudii*, mas estudos adicionais precisam ser conduzidos para desvendar quais os outros componentes da planta e a participação desses nas atividades biológicas.

7. REFERÊNCIAS

- Aebi H. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol.* 1984;105(1947):121–6.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública: Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição [Internet]. Consulta Pública nº 310, de 10 de fevereiro de 2017. 2017. p. 19–20. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3233336/CONSULTA+PUBLICA+N+310+COFAR.pdf/47757546-f5c1-42e6-9f47-8304b8f81003>
- Al-Shobaili HA. Correlation of clinical efficacy and psychosocial impact on vitiligo patients by excimer laser treatment. *Ann Saudi Med.* 2014;
- Alam MB, Seo BJ, Zhao P, Lee SH. Anti-melanogenic activities of *Heracleum moellendorffii* via ERK1/2-mediated MITF downregulation. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016;17(11).
- Aljebab F, Choonara I, Conroy S. Systematic review of the toxicity of short-course oral corticosteroids in children. *Archives of Disease in Childhood.* 2016;
- Birlea SA, Goldstein NB, Norris DA. Repigmentation through Melanocyte Regeneration in Vitiligo. *Dermatologic Clinics.* 2017;35(2):205–18.
- Brenner M, Hearing VJ. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry Photobiology.* 2008;84(3):539–49.
- Carletti G, Nervo G, Cattivelli L. Flavonoids and melanins: A common strategy across two kingdoms. *International Journal of Biological Sciences.* 2014;10(10):1159–70.
- Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. Vol. 5, *Materials.* 2012. p. 1661–85.
- Da Cunha LC, De Paula JR, De Sá VA, E Amorim MEDP, Barros ICM, Brito LAB, et al. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trecul. root extract in mice: Determination of both approximate and median lethal doses. *Brazilian Journal of Pharmacogn.* 2008;18(4):532–8.

- D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. Vol. 17, International Journal of Molecular Sciences. 2016.
- Di Dalmazi G, Hirshberg J, Lyle D, Freij JB, Caturegli P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. Vol. 7, Autoimmunity Highlights. 2016a.
- Di Dalmazi G, Hirshberg J, Lyle D, Freij JB, Caturegli P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. Autoimmun Highlights. 2016b;7(1):1–11.
- Dueholm B, Krieger C, Drew D, Olry A, Kamo T, Taboureau O, et al. Evolution of substrate recognition sites (SRSs) in cytochromes P450 from Apiaceae exemplified by the CYP71AJ subfamily. BMC Evolutionary Biology [Internet]. 2015;15(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-015-0396-z>
- Dugrand-Judek A, Olry A, Hehn A, Costantino G, Ollitrault P, Froelicher Y, et al. The distribution of coumarins and furanocoumarins in Citrus species closely matches Citrus phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. PLoS One. 2015;10(11).
- Eleftheriadou V, Whitton ME, Gawkrödger DJ, Batchelor J, Corne J, Lamb B, et al. Future research into the treatment of vitiligo: Where should our priorities lie? Results of the vitiligo priority setting partnership. The British Journal of Dermatology. 2011;
- Esmat S, Hegazy RA, Shalaby S, Chu-Sung Hu S, Lan CCE. Phototherapy and Combination Therapies for Vitiligo. Dermatol Clin. 2017;35(2):171–92.
- Ezzedine K, Lim H W, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CCE, Goh B K, Anbar T, Silva de Castro C, Lee AY, Parsad D, Van Geel N, Le Poole IC, Oiso N, Benzekri L, Spritz R, Gauthier Y, Hann SK, Picardo M. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: The Vitiligo Global Issues Consensus Conference. Pigment Cell Melanoma Res. 2012;25(3):1–28.
- Faria AR, Mira MT, Tarlé RG, Silva de Castro CC, Dellatorre G. Vitiligo - Part 2 - Classification, histopathology and treatment. Anais Brasileiros Dermatologia. 2014a;89(5):784–90.
- Faria AR, Mira MT, Tarlé RG, Silva de Castro CC, Dellatorre G. Vitiligo - Part 2 -

Classification, histopathology and treatment. Vol. 89, Anais Brasileiros de Dermatologia. 2014b. p. 784–90.

Faria RAPG, De Fatima Barbosa Coelho M, De Figueiredo E Albuquerque MC, De Azevedo RAB. Fenologia de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae) no cerrado de mato grosso. Cienc Florest. 2015;25(1):67–75.

Faria RAPG, Silva AN, Albuquerque MCF, Coelho MFB. Características biométricas e emergência de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Trec. oriundas de diferentes procedências do cerrado mato-grossense. Rev Bras Plantas Med. 2009;11(4):414–21.

Filho OP, Oliveira LA, Martins F, Borges L, de Freitas O, da Conceição E. Obtainment of pellets using the standardized liquid extract of *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). Pharmacogn Mag [Internet]. 2015;11(41):170.

Galván I, Alonso-Alvarez C, Negro JJ. Relationships between Hair Melanization, Glutathione Levels, and Senescence in Wild Boars. Physiol Biochem Zool. 2012;

Gianfaldoni S, Tchernev G, Wollina U, Grazia Rocchia M, Fioranelli M, Lotti J, Rovesti M, Satolli F, Valle Y, Goren A, Tirant M, Situm M, Kovacevic M, França K, Lotti T. Micro -Focused Phototherapy Associated To Janus Kinase Inhibitor: A Promising Valid Therapeutic Option for Patients with Localized Vitiligo. Maced Open Access Maced J Med Sci Jan. 2018a;

Gianfaldoni S, Tchernev G, Wollina U, Lotti J, Rovesti M, Satolli F, et al. Vitiligo in Children : What ' s New i n Treatment ? Excimer lasers. 2018b;6(1):221–5.

Gianfaldoni S, Wollina U, Tchernev G, Lotti J, França K, Lotti T. Vitiligo in Children : A Review of Conventional Treatments. 2018c;6(1):213–7.

Guo L-Q, Yamazoe Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. Acta Pharmacol Sin. 2004;25(2):129–36.

Harris JE. Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: Lessons learned from vitiligo. Immunol Rev. 2016;

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 1976;74(1):214–26.

- Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). *Acta Bot Brasilica* [Internet]. 2007;21(3):575–97.
- Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. *Acta bot bras*. 2010;21(3):575–97.
- Karst SM, Tibbetts SA. Recent advances in understanding norovirus pathogenesis. *J Med Virol*. 2016;88(11):1837–43.
- Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic Med Chem*. 2005;13(2):433–41.
- Kim HJ, Kim IS, Dong Y, Lee IS, Kim JS, Kim JS, Woo JT, Cha BY. Melanogenesis-inducing effect of cirsimaritin through increases in microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8772–88.
- Kormos B, Belso N, Bebes A, Szabad G, Bacsa S, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgo Z. In vitro dedifferentiation of melanocytes from adult epidermis. *PLoS One*. 2011;
- Leão AR, Luiz Da Cunha C, Parente LML, Castro LCM, Chaul A, Carvalho HE, Rodrigues VB, Bastos MA. Avaliação Clínica Toxicológica Preliminar Do Viticromin ® Em Pacientes Com Vitiligo Preliminary clinical toxicological approach of Viticromin ® in vitiligo's patient. *Rev Eletrônica Farmácia*. 2005;2(1):15–23.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757–72.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;
- Lourenço M V. Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento " V ". 2001.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
- Macedo, M.; Ferreira AR. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev Bras Farmacogn*. 2004;14(1):40–4.
- Martins F, Pascoa H, de Paula J, da Conceição E. Technical aspects on production of fluid extract from *Brosimum gaudichaudii* Trécul roots. *Pharmacogn Mag [Internet]*. 2015;11(41):226.
- Martins FS. Estudo sistemático da ação melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. 2016;76.
- Medsker B, Forno E, Simhan H, Juan C, Sciences R. HHS Public Access. 2016;70(12):773–9.
- Melough MM, Chun OK. Dietary furocoumarins and skin cancer: A review of current biological evidence. *Food Chem Toxicol [Internet]*. 2018;122(October):163–71.
- Mengeaud V, Ortonne JP. PUVA (5-Methoxypsoralen plus UVA) enhances melanogenesis and modulates expression of melanogenic proteins in cultured melanocytes. *J Invest Dermatol*. 1996;107(1):57–62.
- Miot LDB, Miot HA, Silva MG Da, Marques MEA. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol*. 2009;84(6):623–35.
- Mohammed GF. Highlights in pathogenesis of vitiligo. *World J Clin Cases*. 2015;
- Monteiro V de FF, Mathias L, Vieira IJC, Schripsema J, Braz-Filho R. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *brosimum gaudichaudii*. *J Braz Chem Soc*. 2002;13(2):281–7.
- Morais MC, De Almeida PHG, Ferreira NLO, Arruda RL, Borges LL, De Freitas O, Conceição EC. Validation of a photostability indicating method for quantification of furanocoumarins from *Brosimum gaudichaudii* soft extract. *Brazilian J Pharmacogn*. 2018;28(1):118–23.
- Moreira CG, Horinouchi CDS, Souza-Filho CS, Campos FR, Barison A, Cabrini DA,

- Otuki MF. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012;141(3):1005–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.047>
- Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development*. 2015;142(4):620–32.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;
- Naini FF, Shooshtari AV, Ebrahimi B, Molaei R. The effect of pseudocatalase / superoxide dismutase in the treatment of vitiligo: A pilot study. *J Res Pharm Pract*. 2012;1(2):77–80.
- Niu C, Pang GX, Li G, Dou J, Nie LF, Himitt H, Kabas M, Aisa HA. Synthesis and biological evaluation of furocoumarin derivatives on melanin synthesis in murine B16 cells for the treatment of vitiligo. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2016;24(22):5960–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.056>
- Niu C, Yin L, Aisa HA. Novel Furocoumarin Derivatives Stimulate Melanogenesis in B16 Melanoma Cells by Up-Regulation of MITF and TYR Family via Akt / GSK3 β / β -Catenin Signaling Pathways. 2018;1.
- Oh TI, Yun JM, Park EJ, Kim YS, Lee YM, Lim JH. Plumbagin suppresses α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1–2):19–39.
- Pozetti GL. "Contribuição ao estudo químico do *Brosimum gaudichaudii* Trecul. 1. "Isolamento e identificação do bergapteno e do psoraleno das raízes do *Brosimum gaudichaudii* Trecul". *Rev Fac Farm Odontol Araraquara*. 1969;
- Pozetti GL. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): Da planta ao medicamento. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl*. 2005;26(3):159–66.
- Quintão WDSC. Desenvolvimento, Caracterização E Avaliação In Vitro De Nanoemulsões O/A A Partir De Extratos De *Brosimum Gaudichaudii* (Mama-

- Cadela) Como Alternativa Para O Tratamento Tópico De Vitiligo. 2018.
- Rashighi M, Harris JE. Vitiligo Pathogenesis and Emerging Treatments. *Dermatol Clin* [Internet]. 2017;35(2):257–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2016.11.014>
- Read J, Wadt KAW, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet*. 2015;
- Richmond JM, Frisoli ML, Harris JE. Innate immune mechanisms in vitiligo: Danger from within. Vol. 25, *Current Opinion in Immunology*. 2013. p. 676–82.
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(5):837–41.
- Schnetzler BN, Teixeira SP, Marinho CR. Trichomes that secrete substances of a mixed nature in the vegetative and reproductive organs of some species of *Moraceae*. *Acta Bot Brasilica* [Internet]. 2017;31(3):392–402.
- Silva AF, Rabelo MFR, Enoque MM. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. *Rev Bras Plantas Med*. 2015;17(4):1016–30.
- Silva DB, Vieira RF, Cordeiro MCT, Pereira EBC, Pereira A V. Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(2):151–6.
- Sim MO, Ham JR, Lee MK. Young leaves of reed (*Phragmites communis*) suppress melanogenesis and oxidative stress in B16F10 melanoma cells. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;93:165–71.
- Singh M, Mukhopadhyay K. Alpha-melanocyte stimulating hormone: An emerging anti-inflammatory antimicrobial peptide. *BioMed Research International*. 2014.
- Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1989;179(1):8–18.
- Spritz RA, Andersen GHL. Genetics of Vitiligo. Vol. 35, *Dermatologic Clinics*. 2017. p. 245–55.
- Tarlé RG, do Nascimento LM, Mira MT, de Castro CCS. Vitiligo - Part 1. Vol. 89,

- Anais Brasileiros de Dermatologia. 2014. p. 461–70.
- Teasdale E, Muller I, Abdullah Sani A, Thomas KS, Stuart B, Santer M. Views and experiences of seeking information and help for vitiligo: A qualitative study of written accounts. *BMJ Open*. 2018;
- The Plant List. The Plant List. [Internet]. Vol. 1.1, Internet. 2013. p. 3–9. Available from: <http://www.theplantlist.org/>
- Varanda EA, Pozetti GL, Lourenço MV, Vilegas W, Raddi MSG. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *J Ethnopharmacol*. 2002;81(2):257–64.
- Wang P le, Yao Z hong, Zhang F xiang, Shen X yu, Dai Y, Qin L, Yao XS. Identification of metabolites of PSORALEAE FRUCTUS in rats by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry analysis. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2015;112:23–35.
- Wang YF, Liu YN, Xiong W, Yan DM, Zhu Y, Gao XM, Xu YT, Qi AD. A UPLC-MS/MS method for in vivo and in vitro pharmacokinetic studies of psoralenoside, isopsoralenoside, psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* extract. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):609–17.
- Weschawalit S, Thongthip S, Phutrakool P, Asawanonda P. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;
- Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- Zhang Y, Chen Z, Xu X, Zhou Q, Liu X, Liao L, Zhang Z, Wang Z. Rapid separation and simultaneous quantitative determination of 13 constituents in *Psoraleae Fructus* by a single marker using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J Sep Sci*. 2017;

ANEXO I

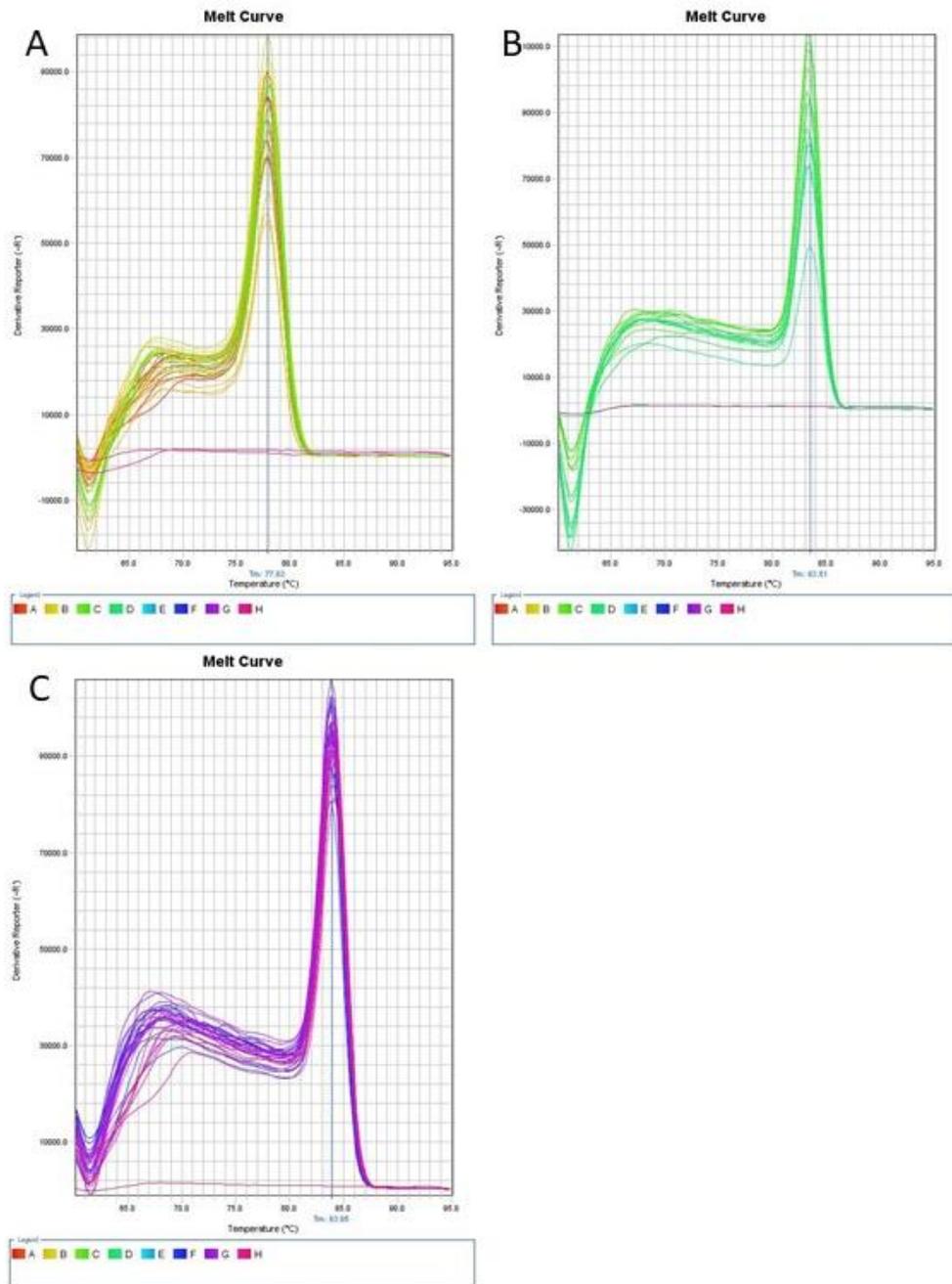


Figura 16. Curva de dissociação (curva de melting) dos produtos de amplificação.
 Genes: TYR (A), MITF (B), GAPDH (C).

ANEXO II

Tabela 5. Parâmetros de validação obtidos no teste de eficiência.

Parâmetros analisados ($y=ax+b$)	Genes		
	GAPDH	TYR	MITF
Inclinação da reta (slope x)	-3,100	-3,138	-3,576
Y- intercept (b)	21,724	29,968	31,957
Coefficiente de correlação linear (r)	0,992	0,992	0,994
Eficiência (%)	110,16	108,283	90,393

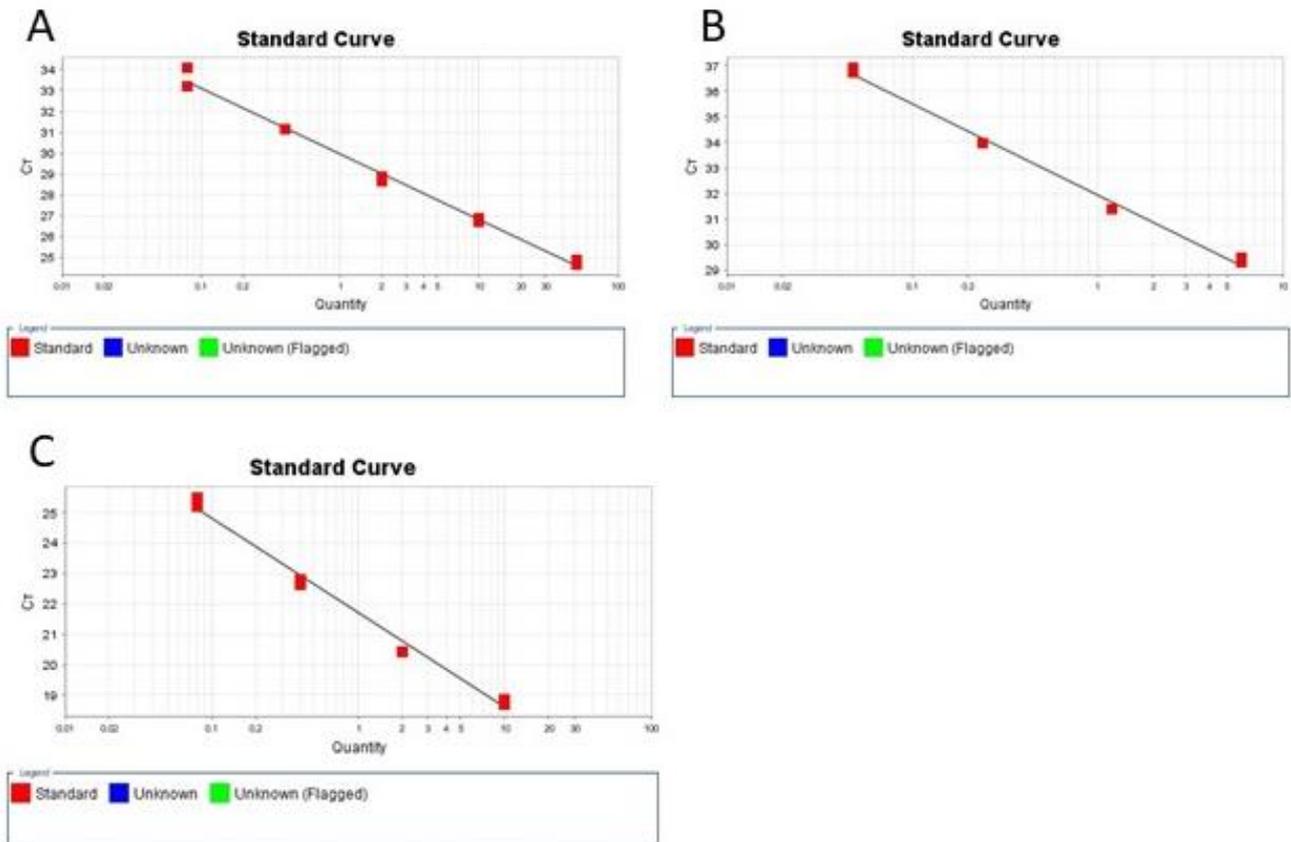


Figura 17 Curva padrão.
Genes: TYR (A), MITF (B), GAPDH (C).