

Perfis transcricionais da melanogênese e genes relacionados a antioxidantes enzimáticos em peles com hiperpigmentação periorbital

Transcriptional profiles of melanogenesis and genes related to enzymatic antioxidants in skins with periorbital hyperpigmentation

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.20191131413>

RESUMO

Introdução: A identificação das causas da hiperpigmentação periorbital é crucial na seleção do melhor tratamento. A identificação de perfis transcricionais que podem estar relacionados com a hiperpigmentação ao redor das áreas oculares poderia contribuir para uma nova abordagem no tratamento da hiperpigmentação periorbital, -a terapia genética-.

Objetivo: Este estudo tem como objetivo avaliar o perfil transcricional da melanogênese e genes relacionados a antioxidantes enzimáticos, em peles com hiperpigmentação periorbital.

Métodos: Com base na avaliação clínica, 49 voluntários saudáveis foram classificados em grupos com ou sem hiperpigmentação periorbital. Perfis genéticos de genes relacionados à melanogênese: -fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), pró-opiomelanocortina (POMC), receptor da melanocortina 1, (MC1R), tirosinase (TYR), proteína relacionada à tirosinase 1 (TYRP1)-, e antioxidantes intracelulares: -glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase 1 (GPx-1), glutathione s-transferase (GST-1)- foram determinadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Resultados: as expressões dos genes MITF, TYR e TYRP1 foram significativamente maiores no grupo com hiperpigmentação periorbital. ($p < 0,01$). As expressões gênicas de GR, GPx-1 e GST-1 foram comparáveis entre os grupos com e sem hiperpigmentação periorbital.

Conclusões: Os resultados deste estudo sugerem que o MITF é o principal regulador da deposição de melanina em peles com hiperpigmentação periorbital. O MITF com regulação positiva está intimamente associado ao aumento da TYR e TYRP1. Esses achados são importantes na proposição de uma nova abordagem terapêutica no tratamento da hiperpigmentação periorbital.

Palavras-chave: Hiperpigmentação; Melaninas; Fator de transcrição associado à microftalmia

ABSTRACT

Introduction: Identifying the causes of periorbital hyperpigmentation is crucial in selecting the best treatment. The identification of transcriptional profiles that may be related to hyperpigmentation around the eye area could contribute to a new approach in the treatment of periorbital hyperpigmentation – the gene therapy.

Objective: This study aims to assess the transcriptional profile of melanogenesis, and genes related to enzymatic antioxidants in skins with periorbital hyperpigmentation.

Methods: Based on clinical evaluation, 49 healthy volunteers were classified with or without periorbital hyperpigmentation. Genetic profiles of melanogenesis-related genes: microphthalmia-associated transcription factor (MITF), pro-opiomelanocortin (POMC), melanocortin 1 receptor (MC1R), tyrosinase (TYR), tyrosinase 1-related protein (TYRP1), and intracellular antioxidants - glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase 1 (GPx-1), glutathione s-transferase (GST-1) - were determined by the polymerase chain reaction technique in real-time.

Results: MITF, TYR, and TYRP1 gene expressions were significantly higher in the periorbital hyperpigmentation group ($p < 0.01$). GR, GPx-1, and GST-1 gene expressions were comparable between the groups with and without periorbital hyperpigmentation.

Conclusions: The results of this study suggest that MITF is the primary regulator of melanin deposition in skins with periorbital hyperpigmentation. Up-regulated MITF is closely associated with increased TYR and TYRP1. These findings are essential in proposing a new therapeutic approach in the treatment of periorbital hyperpigmentation.

Keywords: Hyperpigmentation; Melanins; Microphthalmia-associated transcription factor

Artigo Original

Autores:

Lee Siew-Keah¹
Chua Ang Lim²
Chia Kam Weng³
Lee Chew Kek⁴
Lee Bang Rom⁵
Lim Chai Leng⁶
Tan Geok Puan⁷

¹ Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, Universiti Tunku Abdul Rahman – Kajang (Selangor), Malaysia.

² Faculdade de Medicina, Universiti Teknologi Mara (UiTM) – Sungai Buloh (Selangor), Malaysia.

³ Faculdade de Ciências Aplicadas, UCSI University – Cheras (Kuala Lumpur), Malaysia.

⁴ Hospital Pantai Cheras – Cheras (Kuala Lumpur), Malaysia.

⁵ Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, Universiti Putra Malaysia – Serdang (Selangor), Malaysia.

⁶ Clínica de Cirurgia Plástica e Cosmética Lim – Kuala Lumpur, Malaysia.

⁷ Sunway Medical Centre – Petaling Jaya (Selangor), Malaysia.

Correspondência:

Lee Siew Keah
Faculdade de Medicina e Ciências Médicas, Universiti Tunku Abdul Rahman, Bandar Sungai Long, 43000 Kajang, Selangor, Malaysia.
E-mail: leesiewkeah@yahoo.co.uk

Data de recebimento: 18/06/2019

Data de aprovação: 18/08/2019

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina e Ciências Médicas, Universiti Tunku Abdul Rahman – Bandar Sungai Long, Selangor, Malaysia.

Suporte Financeiro: Este projeto é financiado pela Universidade UCSI, CERVIE-RGS (Proj-In-FPS-006).

Conflito de interesse: Nenhum.



INTRODUÇÃO

A hiperpigmentação periorbital (HPO), vulgarmente conhecida como olheira, caracteriza-se por máculas e manchas hiperocrômicas homogêneas e bilaterais, envolvendo principalmente as pálpebras inferiores e/ou superiores; em alguns casos graves, estende-se às sobrancelhas, regiões malares, regiões temporais e região lateral da raiz nasal.¹ A HPO é uma das preocupações cosméticas mais comuns, sendo notadamente resistente ao tratamento.

Os dados sobre incidência e prevalência da HPO são muito escassos e sua patogênese permanece indefinida. Acredita-se que pigmentação excessiva, pálpebra inferior com pele fina e translúcida, sombreamento devido à flacidez da pele e congestão venosa sejam os principais fatores causadores da HPO. Fatores congênitos e genéticos também estão associados ao desenvolvimento da HPO.^{2,3} Recentemente, Verschoree *et al.* avaliaram a distribuição de melanina e hemoglobina usando um método não invasivo – ou seja, análise intracutânea espectrofotométrica (*spectrophotometric intracutaneous analysis* – SIA) – na população indiana. A análise de SIAscope sugeriu que os depósitos de melanina e estase sanguínea podem desempenhar um papel na HPO.⁴ Por outro lado, estudos histológicos revelaram que a biópsia periorbital de pacientes japoneses e brasileiros demonstrou depósito dérmico de melanina, que poderia ser o principal fator contribuinte para a HPO.^{5,6} No entanto, esses autores não mencionaram as principais causas que podem levar à deposição de melanina ao redor das áreas oculares. Além dos estudos histológicos limitados sobre a pele com HPO, até onde sabemos, os papéis da expressão gênica relacionada à pigmentação na HPO ainda não foram elucidados.

Demonstrou-se que a modulação do MITF (do inglês *microphthalmia-associated transcription factor*) pode alterar a pigmentação da pele de suínos Yucatán de pele escura.⁷ Por outro lado, também foi relatado que o MC1R é altamente polimórfico e suas variantes genéticas estão associadas a diversos fenótipos de pigmentação na pele, cabelos e olhos.⁸ Surpreendentemente, relatou-se que suas variantes genéticas também estão associadas a um risco aumentado de distúrbios de hiperpigmentação, ou seja, melanoma cutâneo, que é totalmente independente do tipo de pele e cor do cabelo.⁹ A TYRP-1 (do inglês *tyrosinase related protein 1*) e a proteína 2 relacionada à tirosinase TYRP-2 (do inglês *tyrosinase related protein 2*), presentes na membrana dos melanossomas, são proteínas semelhantes à tirosinase. Seu papel preciso não está claro, mas foi proposto que a TYRP-1 atua na ativação e estabilização da tirosinase, na síntese de melanossomas, no aumento da relação eumelanina/ feomelanina, agindo também contra o estresse oxidativo.¹⁰

O presente estudo pressupõe que a desregulação da expressão gênica relacionada à pigmentação pode envolver o desenvolvimento da HPO. Ainda, levanta a hipótese de que a desregulação de antioxidantes enzimáticos intracelulares pode estar associada à expressão gênica melanogênica regulada em excesso.

METODOLOGIA

Aprovação ética

O Comitê de Ética em Pesquisa Médica (NMRR-13-1267-16770) e o Comitê de Ética em Pesquisa Independente do Sunway Medical Center (011/2013 / ER) foram obtidos antes do início do estudo.

Recrutamento dos sujeitos

Indivíduos saudáveis que haviam solicitado o procedimento de blefaroplastia na Clínica de Cirurgia Plástica Lim (Kuala Lumpur, Malásia) e no Sunway Medical Center (Selangor, Malásia) foram convidados aleatoriamente a participar deste estudo. Foram excluídos indivíduos diagnosticados com nevo de Ota, nevo melanocítico, manchas café com leite, nevo de Hori, efélides, hiperpigmentação pós-inflamatória localizada devido a trauma reconhecível, doenças inflamatórias cutâneas/ ulceração, alergias/ asma, e hiperpigmentação associada a doenças sistêmicas, como doença de Addison.

Um total de 49 sujeitos foram recrutados. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito foi obtido de cada sujeito. Os cirurgiões plásticos avaliaram as áreas palpebrais e as classificaram em peles com hiperpigmentação periorbital (HPO) ou sem hiperpigmentação periorbital (não HPO). As peles palpebrais excisadas após a blefaroplastia foram coletadas e mantidas em formalina a 10% para análise histológica ou solução reagente de estabilização de RNA (RNAlater®) para estudo de expressão gênica. As amostras foram processadas dentro de três dias após a coleta da amostra.

Análise histológica

Tecidos de pele embebidos em parafina foram processados para a técnica de Fontana-Masson para observar a deposição de melanina e o padrão de distribuição em amostras palpebrais. Relatou-se a profundidade da distribuição da melanina, isto é, até a derme papilar ou até a derme reticular.

Extração total de RNA e conversão de cDNA

Uma pequena porção das amostras de biópsia foi preservada no reagente de estabilização de RNAlater® (Qiagen, Alemanha). As amostras foram homogeneizadas usando tubos M GentMACS (Miltenyi Biotec, Alemanha). O mRNA total foi extraído usando o RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Alemanha). A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) foi conduzida com o kit de alta capacidade de RNA para cDNA. Até 2 µg de RNA total foram utilizados na conversão de RNA para cDNA em uma reação de 20 µl. A reação consiste em 10 µl de 2 × RT buffer (solução-tampão), 1 µl de 20 × mix de enzimas, 2 µg de RNA e quantidade suficiente de H₂O livre de nuclease até o volume final de 20 µl.

Análise de expressão gênica

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para determinar o nível de expressão do mRNA associado à melanogênese, bem como ao sistema de defesa antioxidante. Os genes quantificados foram: MITF, POMC, MC1R, TYR e TYRP1, GR, GPX-1 e GST-1. A actina beta (ACTB) atua como o gene de limpeza. As análises de expressão gênica Taqman® foram adquiridas da Applied Biosystem com o código genético Hs01117294_m1 (FTAM), Hs01596743_m1 (POMC), Hs00267167_

s1 (MC1R), Hs00165976_m1 (TYR), Hs00167051_m1 (TYRP1), Hs00167051_m1 (GRS), Hs00167051_m1 (GPx-1) Hs00220393_m1 (GST-1) e Hs99999903_m1 (ACTB).

A PCR em tempo real foi realizada em 20 µL de mistura de reação consistindo em 2 µL de cDNA modelo, 1 µL de Taqman® Gene Expression Assay e Taqman® Fast Advanced Master Mix. A amostra foi inicialmente desnaturada a 95°C por 20 s, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 s e uma etapa de recozimento a 60 °C por 20 s. Os dados foram coletados no final de cada etapa de recozimento. A expressão relativa do mRNA foi determinada pelo método comparativo de 2^{-ΔΔCT}.

Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados utilizando o software estatístico SPSS 18.0. Os dados contínuos distribuídos normalmente foram analisados pelo teste estatístico paramétrico e expressos em média e desvio padrão. Os dados categóricos foram analisados pelo teste do qui-quadrado.

RESULTADOS

A. Dados demográficos e associação com HPO

Quarenta e nove pacientes (10 homens e 39 mulheres) com idade média de 52,9 ± 9,2 anos preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo. Um total de 47% (n=23) dos indivíduos foram avaliados com HPO, e 53% (n=26) foram incluídos no grupo não HPO. Um total de 67,3% dos sujeitos eram fototipo III na escala Fitzpatrick, enquanto 22,3% eram fototipo IV, 8% eram fototipo I e 2% eram fototipo V na escala. O qui-quadrado de Pearson mostrou que a classificação na escala de Fitzpatrick não estava associada ao grupo HPO (c² = 2,675; p = 0,445). No entanto, o qui-quadrado de Pearson demonstrou que a invaginação do depósito de melanina na camada dérmica era mais proeminente no grupo HPO em comparação com o grupo não HPO (c² = 8,349; p <0,05; Tabela 1).

B. Estudo da expressão gênica

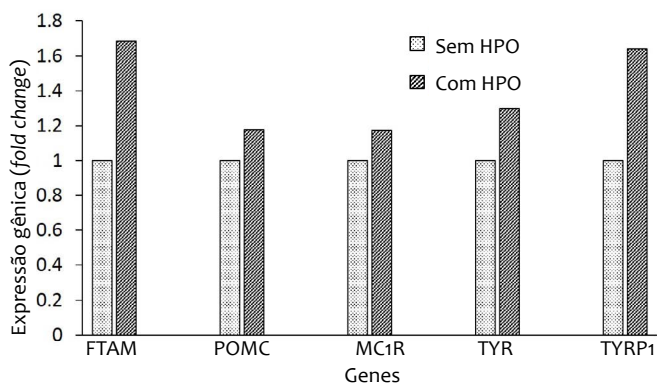
As expressões dos genes MITE, TYR e TYRP1 foram significativamente maiores no grupo HPO (p <0,01, Gráfico 1). As expressões gênicas de GR, GPx-1 e GST-1 foram comparáveis entre os grupos HPO e não HPO (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os achados deste estudo sugerem que: (i) a hiperpigmentação dérmica pode ser a causa subjacente predominante da hiperpigmentação periorbital, que pode estar associada à (ii) superexpressão de MITE, TYR e TYRP1, o que, por sua vez, desencadeia a melanogênese nas peles periorbitais.

De acordo com os achados deste estudo, crescentes evidências demonstraram que a pigmentação ao redor das pálpebras não se restringe à camada epidérmica, sendo também profunda na camada dérmica e resistente a tratamentos.^{2, 6, 11-14} A melanina que cai na derme reticular é normalmente fagocitada por macrófagos para formar melanóforos, causando uma aparência azulada. A hiperpigmentação dérmica é menos responsiva aos agentes despigmentantes comuns parcialmente porque a maioria das terapias despigmentantes se concentra na hiperpigmentação epidérmica e não são eficazes na eliminação dos melanóforos dérmicos. Os resultados deste estudo sugerem que a incorporação dos agentes despigmentantes tópicos na administração transdérmica de medicamentos pode ser benéfica na redução da hiperpigmentação dérmica. Por exemplo, a utilização de um veículo transdérmico como o peptídeo sintético ACSSPSKHCG (TD1) e oligoarginina (R8) pode ser benéfica no tratamento da hiperpigmentação periorbital. No entanto, qual molécula terapêutica deve ser entregue à camada dérmica para alcançar o efeito terapêutico máximo? Vários estudos se concentraram em analisar os papéis despigmentantes dos inibidores da TYR, mas poucos consideraram o MITF como um alvo de medicamentos para o tratamento de distúrbios de hiperpigmentação, especialmente a hiperpigmentação periorbital.

Cremses tópicos para os olhos, principalmente os agentes inibidores da tirosinase, ou seja, hidroquinona, ácido azelaico, tretinoína e ácido kójico, são amplamente utilizados como agentes despigmentantes.^{15, 16} Contudo, seus efeitos terapêuticos são inconsistentes e insatisfatórios no tratamento da hiperpigmentação periorbital. Tratamentos a laser e luz intensa pulsada são novas abordagens para remover os pigmentos da pele da pálpebra inferior.¹⁷ Ainda assim, são relativamente mais caros e exigem profissionais altamente qualificados para conduzir os procedimentos. Portanto, estratégias inovadoras são necessárias



** p<0,01 comparado com o grupo sem HPO

GRÁFICO 1: Fold change da expressão gênica dos grupos com e sem HPO

TABELA 1: PROFUNDIDADE DA DISTRIBUIÇÃO DE MELANINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O GRUPO HPO

Classificação HPO/ Profundidade da distribuição da melanina	HPO (n = 26)	Não HPO (n = 23)	Total (n)	Qui-quadrado de Pearson
Derme papilar	11	19	30	(c ² = 8,349, p < 0,05)
Derme reticular	15	4	19	
Total (n)	26	23	49	

TABELA 2: FOLD-CHANGE DOS GENES GR, GPX-1 E GST-1 EM GRUPOS NÃO HPO E HPO

Gene/Grupo	Expressão gênica (Fold-change)	
	Não HPO	HPO
GRS	1 ± 0,51	0,90 ± 0,41
GPx-1	1 ± 0,93	0,86 ± 0,68
GST-1	1 ± 0,48	1,06 ± 0,49

para identificar novos alvos de drogas. Este estudo propõe que a supressão direcionada do MITF, em vez de seus genes melanogênicos a jusante, como TYR e TRP-1, seria um candidato melhor para uma nova geração de agentes despigmentantes.

O MITF é um regulador-chave que envolve o desenvolvimento e a pigmentação melanocítica. Assim, é essencial para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células pigmentares, os melanócitos.¹⁰ A atividade do MITF é controlada por três vias de sinalização mais conhecidas, que são a via dependente de cAMP (via MC1R), a via de sinalização da Wnt e a via de sinalização da ERK (ambas via receptor c-Kit). Ao ligar α -MSH (também conhecida como pró-opiomelanocortina - POMC) ao seu receptor de membrana plasmática, o MC1R ativa a via dependente de cAMP e, eventualmente, aumenta a atividade do MITF, estimulando a melanogênese.¹⁰ Os resultados deste estudo sugerem que a superexpressão de MITF é improvável através da ativação da via de sinalização α -MSH-MC1R. Foi demonstrado que, independentemente do nível alto ou baixo de MC1R, o cAMP intracelular elevado desencadeado por *forskolin* leva à indução dos promotores TYR e TYRP-1.¹⁸ Investigações adicionais sobre a associação de MITF com o aumento das vias de sinalização intracelular de cAMP, Wnt e ERK podem fornecer mais informações sobre o mecanismo subjacente da superexpressão de MITF em pálpebras hiperpigmentadas.

Este estudo mostrou que o MITF é altamente expresso em peles com hiperpigmentação periorbital e está intimamente associado ao grau de produção de melanina. Portanto, propõe-se que o MITF é uma molécula-alvo terapêutica potencial no tratamento da hiperpigmentação periorbital. Estudos anteriores mostraram que o silenciamento da expressão do gene MITF por meio da técnica de pequenos RNA de interferência (siRNA), o MITF -siRNA (um modulador negativo de MITF), reduziu significativamente os níveis de TYR, TYRP-1 e MC1R e, portanto, inibiu a melanogênese na cultura de células de melanoma.¹⁹ Ainda, em um estudo clínico, a aplicação tópica de creme MITF-siRNA com veículo transdérmico melhorou significativamente as lesões de hiperpigmentação facial.¹⁹ Como a causa subjacente das olheiras é semelhante à do melasma, principalmente devido à superexpressão de MITF e deposição de melanina na camada dérmica, este estudo sugere que a inovação em MITF -siRNA provavelmente exerce o efeito terapêutico semelhante em peles com hiperpigmentação periorbital.

REFERÊNCIAS

- Sheth PB, Shah HA, Dave JN. Periorbital hyperpigmentation: a study of its prevalence, common causative factors and its association with personal habits and other disorders. *Indian J Dermatol.* 2014; 59(2): 151-7.
- Roh MR, Chung KY. Infraorbital dark circles: definition, causes, and treatment options. *Dermatol Surg.* 2009; 35(8):1163-71.
- Sarkar R. Idiopathic cutaneous hyperchromia at the orbital region or periorbital hyperpigmentation. *J Cutan Aesthet Surg.* 2012; 5(3): 183-4.
- Verschoore M, Gupta S, Sharma VK, Ortonne JP. Determination of Melanin and Haemoglobin in the Skin of Idiopathic Cutaneous Hyperchromia of the Orbital region (ICHOR): A Study of Indian Patients. *J Cutan Aesthet Surg.* 2012; 5(3):176-82.
- Watanabe S, Nakai K, Ohnishi T. Condition known as "dark rings under the eyes" in the Japanese population is a kind of dermal melanocytosis which can be successfully treated by Q-switched ruby laser. *Dermatol Surg.* 2006; 32(6): 785-9.
- Graziosi AC, Quaresma MR, Michalany NS, Ferreira LM. Cutaneous idiopathic hyperchromia of the orbital region (CIHOR): a histopathological study. *Aesthetic Plast Surg.* 2013; 37(2): 434-8.
- Lin CB, Babiary L, Liebel F, Roydon Price E, Kizoulis M, Gendimenico GJ, et al. Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J Invest Dermatol.* 2002; 119(6):1330-40.

Além das estratégias de MITF-siRNA, compostos ou moléculas de fármacos capazes de interferir na regulação pós-transcricional de MITF podem ser utilizados para modular o processo de pigmentação. A DKK1 (dickkopf-1) é encontrada predominantemente nas palmas das mãos e plantas dos pés hipopigmentadas, exibindo atividades de supressão no MITF e, portanto, inibindo o crescimento de melanócitos e a produção de pigmentos.²⁰ Este estudo aponta que a estimulação direcionada de DKK1 poderia ser uma abordagem viável para modular o MITF superexpresso em peles com hiperpigmentação periorbital. Portanto, existem duas condições cruciais na criação de um novo agente terapêutico no tratamento da hiperpigmentação periorbital, ou seja, (i) deve ser uma molécula pequena e capaz de atingir a derme (ii) deve poder entrar na célula e suprimir a expressão do MITF.

A exposição à irradiação ultravioleta (UV) e ao estresse oxidativo tem sido associada à patogênese da hiperpigmentação periorbital.^{1, 21, 22} Demonstrou-se que o UV desencadeia a expressão de MITF, tirosinase e MSH, o que eventualmente leva à produção de pigmentos de melanina.¹⁰ A irradiação UV também é conhecida por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio na pele humana, resultando em estresse oxidativo e fotodano à pele. Os antioxidantes têm sido amplamente utilizados para despigmentação em produtos para a pele, incluindo cremes para os olhos, para reduzir os danos à pele e a deposição de melanina.^{2, 23} Entretanto, este estudo demonstrou que não há diferença significativa nas expressões gênicas dos principais antioxidantes enzimáticos intracelulares, como glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-s-transferase (GST) em peles palpebrais hiperpigmentadas e não hiperpigmentadas. Esses achados sugerem que é improvável que a hiperpigmentação periorbital seja devida a antioxidantes intracelulares inadequados.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que o MITF é o principal regulador da deposição de melanina em peles com HPO, sendo que o MITF com regulação positiva está intimamente associado ao aumento da TYR e TYR-1. Esses achados são importantes na proposição de uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da HPO.●

8. Beaumont KA, Wong SS, Ainger SA, Liu YY, Patel MP, Millhauser GL, et al. Melanocortin MC(1) receptor in human genetics and model systems. *Eur J Pharmacol.* 2011; 660(1): 103-10.
9. Newton-Bishop JA, Chang YM, Iles MM, Taylor JC, Bakker B, Chan M, et al. Melanocytic nevi, nevus genes, and melanoma risk in a large case-control study in the United Kingdom. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(8): 2043-54.
10. Videira IFS, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013; 88(1):76-83.
11. Huang YL, Chang SL, Ma L, Lee MC, Hu S. Clinical analysis and classification of dark eye circle. *Int J Dermatol.* 2014; 53(2):164-70.
12. Ranu H, Thng S, Goh BK, Burger A, Goh CL. Periorbital hyperpigmentation in Asians: an epidemiologic study and a proposed classification. *Dermatol Surg.* 2011; 37(9): 1297-303.
13. Lee Siew-Keah, Margaret Flori Vasthian Patrick, Cheah Shiau Chuen, Tan Chung Keat, Chia Kam Weng, Lee Chew Kek, et al. Evaluation of histopathological changes in idiopathic cutaneous hyperchromia at the orbital region. *Surg Cosmet Dermatol.* 2018; 10(3):202-8.
14. Nayak CS, Giri AS, Zambare US. A Study of Clinicopathological Correlation of Periorbital Hyperpigmentation. *Indian Dermatol Online J.* 2018; 9(4): 245-9.
15. Friedmann DP, Goldman MP. Dark circles: etiology and management options. *Clin Plast Surg.* 2015; 42(1):33-50.
16. Gendler EC. Treatment of periorbital hyperpigmentation. *Aesthet Surg J.* 2005; 25(6): 618-24.
17. Cymbalista NC, Prado de Oliveira ZN. Treatment of idiopathic cutaneous hyperchromia of the orbital region (ICHOR) with intense pulsed light. *Dermatol Surg.* 2006; 32(6): 773-83.
18. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *International journal of molecular sciences.* 2016; 17(7): 1144.
19. Yi X, Zhao G, Zhang H, Guan D, Meng R, Zhang Y, et al. MITF-siRNA formulation is a safe and effective therapy for human melasma. *Mol Ther.* 2011; 19(2): 362-71.
20. Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, Yasumoto K, Abdel-Malek ZA, Kubo T, et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol.* 2004; 165(2): 275-85.
21. Sarkar R, Ranjan R, Garg S, Garg VK, Sonthalia S, Bansal S. Periorbital Hyperpigmentation: A Comprehensive Review. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016; 9(1): 49-55.
22. Roberts WE. Periorbital hyperpigmentation: review of etiology, medical evaluation, and aesthetic treatment. *J Drugs Dermatol.* 2014; 13(4): 472-82.
23. Eberlin S, Del Carmen Velazquez Pereda M, de Campos Dieamant G, Nogueira C, Werka RM, de Souza Queiroz ML. Effects of a Brazilian herbal compound as a cosmetic eyecare for periorbital hyperchromia ("dark circles"). *J Cosmet Dermatol.* 2009; 8(2): 127-35.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Lee Siew-Keah |  ORCID 0000-0001-9299-6842

Análise estatística, Aprovação da versão final do manuscrito, Concepção e planejamento do estudo, Elaboração e redação do manuscrito, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito.

Chua Ang Lim |  ORCID 0000-0002-0369-6766

Aprovação da versão final do manuscrito, Elaboração e redação do manuscrito, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito.

Chia Kam Weng |  ORCID 0000-0002-4928-7925

Aprovação da versão final do manuscrito, Elaboração e redação do manuscrito, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito

Lee Chew Kek |  ORCID 0000-0002-5832-664x

Análise estatística, Aprovação da versão final do manuscrito, Concepção e planejamento do estudo, Elaboração e redação do manuscrito, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito.

Lee Bang Rom |  ORCID 0000-0003-1540-9338

Aprovação da versão final do manuscrito, Concepção e planejamento do estudo, Elaboração e redação do manuscrito, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito.

Lim Chai Leng |  ORCID 0000-0003-0274-2051

Aprovação da versão final do manuscrito, Concepção e planejamento do estudo, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito.

Tan Geok Puan |  ORCID 0000-0001-8446-3173

Aprovação da versão final do manuscrito, Concepção e planejamento do estudo, Elaboração e redação do manuscrito, Obtenção, análise e interpretação dos dados, Participação efetiva na orientação da pesquisa, Participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados, Revisão crítica da literatura, Revisão crítica do manuscrito.