



ISSN: 2230-9926

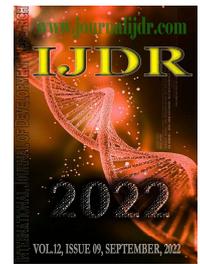
Available online at <http://www.journalijdr.com>

# IJDR

*International Journal of Development Research*

Vol. 12, Issue, 09, pp. 59171-59174, September, 2022

<https://doi.org/10.37118/ijdr.25456.09.2022>



CASE REPORT

OPEN ACCESS

## ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GLU298ASP DO GENE DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL E VITILIGO

Kenia Alves Pereira Lacerda\*<sup>1</sup>, Sabrina Enzo Alves e Lacerda<sup>2</sup>, Kevin Enzo Alves e Lacerda<sup>3</sup>, Revaldo Afonso Silva Júnior<sup>2</sup> and Lídia Andreu Guillo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Goiás - IFGO, Campus Jataí; <sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Centro Universitário de Mineiros - UNIFIMES; <sup>3</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Rio Verde-UNIRV; <sup>4</sup>Universidade Federal de Goiás (UFG), Instituto de Ciências Biológicas. Avenida Esperança s/n, Câmpus Samambaia - Prédio da Reitoria. CEP 74690-900 Goiânia - Goiás - Brasil.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 19<sup>th</sup> August, 2022

Received in revised form

11<sup>th</sup> August, 2022

Accepted 29<sup>th</sup> September, 2022

Published online 30<sup>th</sup> September, 2022

#### Key Words:

Vitiligo, Polimorfismo, Gene, Óxido Nítrico.

#### \*Corresponding author:

Kenia Alves Pereira Lacerda

### ABSTRACT

Objetivou-se investigar se ocorre polimorfismo Glu298Asp do gene óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em um grupo de pacientes com vitiligo e comparar as frequências dos genótipos com um grupo controle da região Centro Oeste do Brasil. O presente estudo incluiu 51 pessoas adultas com vitiligo e 51 pessoas controles. As amostras de sangue total foram obtidas por coleta de sangue venoso periférico em tubo contendo o anticoagulante EDTA, em seguida, realizou-se a extração do DNA. A genotipagem do polimorfismo Glu298Asp foi realizada por análise de PCR-RFLP. Não houve diferença entre as frequências do polimorfismo entre os grupos de indivíduos portadores de vitiligo e controle ( $p > 0,05$ ), sugerindo que as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A investigação sobre a associação do polimorfismo do gene eNOS Glu298Asp com vitiligo, não apresentou diferença significativa na distribuição dos genótipos ( $p > 0,05$ ) e na distribuição das frequências alélicas ( $p = 0,138$ ) entre os portadores de vitiligo e grupo controle. Sabe-se que vários fatores, tais como o perfil genético e etnia da população analisada, podem influenciar no complexo susceptibilidade à doença, portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel do polimorfismo do gene da eNOS na patogênese do vitiligo.

Copyright © 2022, Gabriel Chaves Chaves et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Kenia Alves Pereira Lacerda, Sabrina Enzo Alves e Lacerda, Kevin Enzo Alves e Lacerda, Revaldo Afonso Silva Júnior and Lídia Andreu Guillo, 2022. "Associação entre o polimorfismo glu298asp do gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial e vitiligo", *International Journal of Development Research*, 12, (09), 59171-59174.

## INTRODUCTION

O vitiligo é uma doença crônica da pele, sistêmica adquirida, evidenciada por manchas despigmentadas (WHITTON ME, *et al.*, 2015). O aparecimento de manchas hipocrômicas na pele e mucosas, ocorre devido à perda progressiva de melanócitos funcionais na área afetada (DA LUZ LL, *et al.*, 2014; KOVACS M e PODDA M 2019), sendo que as manchas (lesões) podem aparecer em diferentes formas e tamanhos, estando distribuídas em qualquer área do tegumento (TARLÉ RG, *et al.*, 2014). Segundo Ezzedine K *et al.*, (2012) as lesões podem ser classificadas como: vitiligo não segmentar (NSV), quando se manifesta nos dois lados do corpo, e vitiligo segmentar (SV), manifestando-se apenas em uma parte do corpo. No entanto, recentemente Kovacs M e Podda M (2019) relatam que o vitiligo pode ser classificado em uma terceira forma, quando os sintomas da doença são mistos.

Cerca de 40 a 50 milhões de pessoas em todo mundo têm vitiligo e embora sua forma primária não seja uma ameaça à vida, os efeitos estéticos e psicológicos da doença demandam para uma terapia eficaz, que depende de um melhor entendimento da sua patogênese (RUIZ-ARGÜELLES L, *et al.*, 2007). A patogênese do vitiligo permanece indefinida, embora muitas teorias, como a hipótese auto-imune, a teoria autotóxica, a teoria genética, a teoria neural, a teoria intrínseca e alterações bioquímicas, moleculares e celulares responsáveis por perda de melanócitos em funcionamento no vitiligo foram elaboradas para esclarecer vitiligo como patologia e mostrou que é uma doença multifatorial que envolve muitas interações diferentes (ONGENAE *et al* 2005), podendo afetar pessoas de qualquer idade ou etnia (WHITTON ME *et al.* 2015). A óxido nítrico-sintase (NOS) é uma enzima responsável pela síntese do óxido nítrico. Sendo sintetizado a partir da conversão da arginina em citrulina pela NOS. O óxido nítrico possui importante papel em diversos processos fisiológicos,

tais como em mecanismos da inflamação e autoimunidade (FILHO F e ZILBERSTEIN B, 2000). São três isoformas conhecidas da sintetase (NOS) do óxido nítrico, sendo duas formas constitutivas (eNOS) e uma forma induzida (iNOS) (Alderton W K *et al.*, 2001), em que as isoformas constitutivas são a de óxido nítrico neuronal (nNOS) e a sintetase de óxido nítrico endotelial (eNOS). A eNOS é responsável pela conversão de L-arginina, um aminoácido semi-essencial, em óxido nítrico (NO) e (L-citrulina), (MARKUS *et al.* 1998). O óxido nítrico tem propriedades antioxidantes, que resultam na inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL); tem ações antiapoptóticas sobre as células endoteliais (SIASOS *et al.* 2006) e regula os níveis de homocisteína, cuja elevação é um importante fator de risco para a doença cardiovascular (BROWN *et al.* 2003). O gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) está localizado no cromossomo 7 (Gen Bank D26607), mais especificamente no braço longo do cromossomo 7, na região 7q35-36, apresentando este, peso molecular de 4.4kb, compreendendo 25 íntrons e 26 éxons, responsáveis pela síntese do RNA mensageiro (RNAm) de 4052 nucleotídeos (ABRAMSON *et al.*, 2001). A codificação do gene da eNOS, leva a formação de uma enzima de cadeia polipeptídica contendo 1203 aminoácidos e um peso molecular de 135-kD (MARSDEN *et al.*, 1993). Segundo Wheeler DS e Wong HR, (2001) o polimorfismo genético pode ser determinado como a ocorrência regular em uma população de dois ou mais alelos, localizado em um ponto específico do cromossomo, que apresenta em uma frequência maior que 1%, podendo gerar em deficiências proteicas, tais como: proteína alterada, alteração no nível normal da proteína expressada ou nenhuma mudança na produção ou expressão proteica. Podendo ainda ser caracterizado por substituição, inserção ou deleção de únicos ou múltiplos nucleotídeos no DNA e podem ocorrer nas mais diversas regiões do genoma humano (BALASUBRAMANIAN SP *et al.*, 2004). Um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) denominado Glu 298Asp localizado no éxon 7, caracterizado pela presença de uma Guanina (G – mais comum) e uma timina (T – mais raro) no nucleotídeo 894, a presença de G e T acarreta mudanças do aminoácido glutamato por aspartato na posição 298 (Glu298Asp) da proteína eNOS (DE MARCO, 2010). Esse tipo de SNP, denominado estrutural, é geralmente, responsável por mudanças na estrutura proteica com perda ou redução da função original ou da capacidade de ligação da mesma (NUSSBAUM *et al.* 2002).

Os efeitos biológicos do óxido nítrico (ON) são extremamente variáveis, de acordo com o local, produção e quantidade gerada em alvos no ambiente onde é liberado. Múltiplos fatores são importantes em determinar o papel duplo do ON, fisiológico e fisiopatológico (ABRAMSON, 2001). Embora as mutações do gene da eNOS, tenha sido extensivamente estudada em doenças cardiovasculares (CVD), ainda são necessários mais estudos sobre o seu papel nas doenças inflamatórias (PETRI, 2002). Há uma relevância muito grande para a saúde pública a identificação dos loci que estiverem associados com o risco de desenvolvimento de vitiligo, pois estes genes podem proporcionar novos alvos terapêuticos e profiláticos para novas abordagens intervencionais para tratar e prevenir o vitiligo. A presente pesquisa teve como objetivo investigar a ocorrência o polimorfismo Glu298Asp do gene óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em um grupo de pacientes com vitiligo e comparar as frequências dos genótipos com um grupo controle da região centro oeste do Brasil.

## METODOLOGIA

**Estratégia de pesquisa e critérios de seleção:** O presente estudo incluiu como critério de inclusão 51 pessoas adultas com vitiligo e 50 pessoas controles (sem vitiligo). O presente trabalho foi submetido pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP), sob o número 1.012.653. Os pacientes foram recrutados no ambulatório de um Hospital do Estado de Goiás, Brasil. Durante o período de fevereiro a julho de 2015, depois de tomar ciência e assinar o termo de consentimento livre e

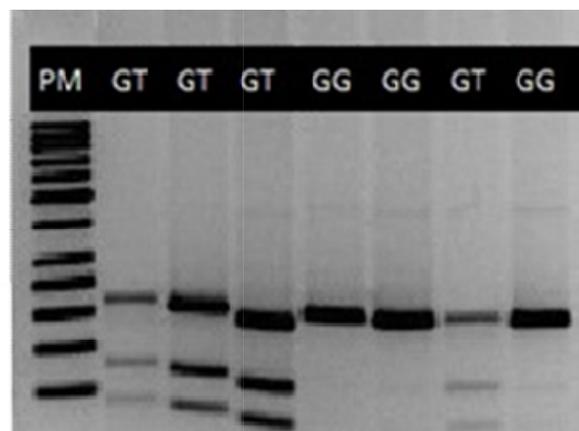
esclarecido. O referido hospital possui um hemocentro, onde foi realizada uma triagem dos doadores que poderiam participar como voluntários na pesquisa (grupo controle), onde estes foram pareados com o grupo caso na idade e gênero, por tratar de uma pesquisa caso controle.

**Amostragem e Extração do DNA:** As amostras de sangue total, foram obtidas por coleta de sangue venoso periférico, em tubo contendo o anticoagulante EDTA, foram refrigeradas de 2 a 8° C e em seguida tiveram o DNA extraído, utilizando o protocolo estabelecido pelo Kit Purelink™ (Invitrogen, USA). A genotipagem do Polimorfismo Glu298Asp, foi realizada por análise de PCR-RFLP, tal como descrito por Hingorani *et al* (1999). Os iniciadores de PCR para o polimorfismo Glu298Asp foram adquiridos pela (Gibco, invitrogen - USA), nas sequências: 50-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-30 (sense) e 50-AGTCAATCCCTTTGGTGTCAC-30 (antisense). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L com a seguinte composição: 50 ng de DNA genômico (até 3  $\mu$ L), 45  $\mu$ L mastermix, 2  $\mu$ L primer e água destilada ultrapura (Gibco, Invitrogen, USA). A PCR foi realizada em termociclador (Techne Inc), nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (95°C por 1 min, 60°C por 1 min, e 70°C por 1 min). A extensão final da reação ocorreu a 70°C por 5 min. Após amplificação por PCR, o produto resultante de 206pb foram digeridos com a enzima de restrição Mbol (Promega-USA) a 37°C por 6h com 1,0  $\mu$ L de enzima em um shaker (Vortemp 56, Labnet). Produtos amplificados e digeridos contendo o alelo G (sem o sítio de restrição) geraram um fragmento de 206 pb, enquanto os produtos de PCR contendo o alelo T (com sítio de restrição) produziram dois fragmentos um 119 e outro com 87 pb. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 3%, e visualizados após a coloração com brometo de etídio e visualizados em um transluminador.

**Análise Estatística:** Os dados foram analisados no programa SPSS, versão 22. Inicialmente, as distribuições dos genótipos foram apresentadas em frequências absolutas e relativas, o teste de qui-quadrado foi utilizado para: a) comparar as diferenças das distribuições dos genótipos observados e esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada grupo (avaliação intragrupo) e b) comparar as diferenças das distribuições genotípicas entre os grupos caso e controle (avaliação intergrupos).

## RESULTADOS

O perfil de bandas obtidas após PCR-RFLP do gene eNOS e identificação do polimorfismo Glu298Asp. Linha 1 padrão de Peso molecular (PM), linhas 2,3,4,7 indivíduos heterozigotos G/T e linhas 5,6,8 indivíduos homozigotos GG (Figura 1). O alelo selvagem (GG) com 206 pb, enquanto a presença de fragmentos 119 e 87 pb representam o alelo mutante.



Fonte: Lacerda K. A. P., Guillo, L. A.

Figura 1. Gel de agarose 3% para o polimorfismo Glu298Asp

A distribuição dos genótipos observados no estudo (Tabela 1), assim como os resultados esperados no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não se verificou diferença estatística na distribuição observada e esperada no grupo controle, sugerindo que as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não se verificou diferença estatística na distribuição dos genótipos entre os grupos caso e controle. Da mesma forma, não foi observado essa diferença nas frequências alélicas entre os grupos ( $p = 0,138$ ) (Tabela 2).

genético ( $n = 51$ ). Além disso, estudos genéticos atuais não se baseiam na análise de apenas um gene, mas de um conjunto de haplótipos relacionados ou mesmo milhares de polimorfismos genéticos simultaneamente.

**Considerações finais:** A investigação sobre a associação do polimorfismo do gene eNOS Glu298Asp com vitiligo, não apresentou diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os portadores de vitiligo e grupo controle.

**Tabela 1. Distribuição dos genótipos (Gen) observados (Obse) e esperados (Esp) no equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos caso (Gcaso) e grupo controle (Gcon)**

Gen	Gcon (n=50)		$p^a$	Gcaso (n=51)		$p^a$
	Obse	Esp <sup>b</sup>		Obse	Esp <sup>b</sup>	
GG	19 (38,0)	21,8 (43,5)	0,079	29 (56,9)	29,1 (57,0)	0,961
GT	28 (56,0)	22,4 (44,9)		19 (37,3)	18,9 (37,0)	
TT	3 (6,0)	5,8 (11,6)		3 (5,9)	3,0 (6,0)	

a. Teste de qui-quadrado; b. esperado no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas (F.) e genotípicas (G.), Modelo dominante (Mod d) e Modelo recessivo (Mod r) em pacientes com vitiligo e grupo controle**

Variáveis	Controle (n = 50)	Casos (n = 51)	OR <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	$p^a$
F. alélica				
G	66 (66,0)	77 (75,5)	1,00	
T	34 (34,0)	25 (24,5)	0,63 (0,34-1,21)	0,138
Genótipos				
GG	19(38,0)	29 (56,9)	2,24 (0,99-5,11)	0,053
GT	28 (56,0)	19 (37,3)	1,00	
TT	3 (6,0)	3 (5,8)	1,47 (0,26-8,09)	0,655
Mod d				
GG	19 (38,0)	29 (56,9)	2,15 (0,97-4,76)	0,059
GT+TT	31 (62,0)	22 (43,1)	1,00	0,059
Mod. r				
TT	3 (6,0)	3 (5,9)	1,00	
GG+GT	47 (94,0)	48 (94,1)	1,02 (0,19-5,31)	0,980

a. Valores de  $p$  derivados da estatística de Wald; b. Odds ratio; c. Intervalo de confiança de 95%.

## DISCUSSÃO

A distribuição do genótipo do polimorfismo Glu298Asp em pessoas com vitiligo e grupo controle apresentou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O grupo controle apresentou uma frequência maior do genótipo GT (56,0%), seguido do par GG (38,0%) e por último o par TT (3,0%), seguindo os padrões de distribuição genotípicas observados por Rossi *et al.*, (2003) e Metzger *et al.*, (2007) que realizaram estudos populacionais onde avaliaram a distribuição do polimorfismo para o gene da eNOS. Já o grupo caso de nosso estudo, apresentou inversão na frequência, com predominância do genótipo GG (56,9%) seguido por GT (37,3%) e por último TT (5,9%), portanto, não se verificou diferença estatística na distribuição dos genótipos para o polimorfismo eNOS entre os grupos caso e controle ( $p > 0,05$ ). Polimorfismo localizado no exon 7, Glu298Asp, altera a estrutura primária da proteína, o que poderia levar a alterações funcionais na enzima. Alguns estudos tem relacionado esse polimorfismo à hipertensão, doença arterial coronariana (CAD) e espasmos coronários, enquanto outros não encontraram associação com (CAD) ou hipertensão (Janchymova *et al.* (2001), Albrecht *et al.* (2003)). O polimorfismo Glu 298Asp foi associado a uma produção basal de óxido nítrico (ON) reduzida, podendo levar implicações funcionais no desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão (Veldman, 2001). Este é o primeiro estudo a investigar o polimorfismo do gene eNOS Glu298Asp em pessoas com vitiligo. Embora não tenhamos encontrado uma associação entre o polimorfismo e vitiligo, é possível que com uma população maior possa indicar um papel para este polimorfismo na patologia do vitiligo. Neste primeiro estudo relatado, apresenta resultados não significantes estatisticamente, entretanto, são potencialmente importantes e requerem mais uma confirmação em outras populações com grupos maiores. Certas limitações são inerentes a este estudo. A primeira é a amostra, provavelmente pequena para um estudo

Da mesma forma, não observou diferença significativa nas frequências alélicas entre os portadores de vitiligo e não portadores. Sabe-se que vários fatores, tais como o fundo genético e etnia da população analisada, podem influenciar no complexo susceptibilidade à doença, portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel da eNOS polimorfismos na patogênese das manifestações clínicas do vitiligo.

**Agradecimentos:** Agradecemos a FAPEG pela bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S. B., *et al.*, The role nitric oxide in tissue destruction. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol*, 2001, v.15 (5) p.831-45.
- ALBRECHT, E.; STEGEMAN, C. A.; HEERINGA, P. HENNING, vanGOOR, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthesis, *J PatHol*. 2003, v.199, p. 8-34.
- ALDERTON, W. K, COOPER, C. E., KNOLES, R.G. Nitric Oxide Synthases: structure, function, and inhibition. *Biochem*. 2001, v.357, p. 593-615.
- BALASUBRAMANIAN, S. P, COX A, BROWN N. J, REED, M. W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2004, v. 30: p.593-601.
- BROWN, K. S., L. A. J.; KLUIJTMANS, I. S. Young, J. Woodside, J. W.G. Yarnell, D. McMaster, L. Murray, A. E.Evans, C. A. Boreham, H. Evidence That Nitric Oxide Modulates Homocysteine: TheNOS3 894TT Genotype Is a Risk Factor for Hyperhomocystenemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2003.v.23(6),p. 1014 – 1020.
- DA LUZ, L. L.; DOS SANTOS, S. L.; PARTATA, A. K. Vitiligo e Seu Tratamento. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, 2014; 7(3).

- DE MARCO, K. C.; Avaliação da Interação entre os polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos opostos a mercúrio. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2010. Universidade de São Paulo.
- EZZEDINE, K.; Lim, H. W.; Suzuki T, *et al.* Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012, v.25: p.1–13.
- FILHO, F. R., Zilberstein B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções.* Revista da Associação Médica Brasileira, 46(3), 265-271,(2000).
- HINGORANI, A. D, Liang, C. F, Fatibene, J. Lyon, A. Monteith, S. Parsons, A. Haydock, S. Hooper, R. V, Stephens, N. G, O'shaughnessy, K. M *et al.* A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999, v.100,p.1515– 1520.
- JACHYMOVA, M., Horky, K., Bultas, J. Kozich, V. Jindra, A. Peleska, J. Association Glu298Asp synthase gene polymorphism in the endothelial nitric oxide with essential hypertension resistant to conventional therapy *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. v. 284, p. 426-430.
- KOVACS, M.; PODDA, M. Reply to comment: Guselkumab in the treatment of severe hidradenitis suppurativa. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2019.
- MARKUS, H. Y.; Ruijgrok, N.; ALI, J. F. Powell. Endothelial Nitric Oxide Synthase Exon 7 Polymorphism. *Ischemic Cerebrovascular Disease, and Carotid Atheroma Stroke.* 1998. v.29, p.1908-1911.
- MARSDEN, P. A.; Heng, H. H.; Scherer, S. W.; Stewart, R. J.; HALL A. V.; Shi,X.M.; Tsui, L.C, Schappert, K.T. Structure and cromossomal localization of the humam constitutive endothelial nitric oxide syntase gene. *J Biol Chem.* 1993. v. 268, p. 17478-17488.
- METZGER, I. F.; Sertório, J. T.; Tanus-santos, J. E. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med.* 2007. v.43, n.6, p.987-92.
- NUSSBAUM, R. L. *et al.* Variação Genética em Indivíduos: Mutação e Polimorfismo. In: \_\_\_\_\_. *Genética Médica: Thompson & Thompson.* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 47-62, 2002.
- ONGENAE K.; Van Geel N.; De Schepper S, Naeyaert JM. Effect of vitiligo on self-reported health-related quality of life. *Br J Dermatol.* 2005;152(6):1165-72.
- PETRI, M., pdemiology of systemic lúpus ertematosus; *Best Pract. Res. Clin. Rheumathol.* 2002. v.16 (5): P. 847-58.
- ROSSI, G. P.; Taddei, S.; Viridis, A.; Cavallin, M.; Giadonii, L.; Favilla, S. *et al.* The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endotelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients, *J. Am. Coll Cardiol.* 2003. v. 41, n 6, p. 938-945.
- RUIZ-ARGUELLES, A.; Brito, G. J.; Izquierdo, P. R. Romano, B. P.; Sanchez -Sosa, S. Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. *Journal of Autoimmunity.* 2007. v.29, p. 281-286.
- SIASOS, G. D.; Tousoulis, C. Antoniadis, E. Stefan & Watanabeadi, A, C. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: An alternative treatment for premature atherosclerosis? *International Journal of Cardiology.* 2006.v.116 (3), p. 300-308.
- TARLÉ, R. G, Nascimento, L.M, Mira, M. T, Silva de Castro, C.C.Vitiligo - Part 1. *An Bras Dermatol.*v.89(3), p.461-70, 2014.
- VELDMAN, B. Rongen, G. Functional gene testing of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase. *J. Hypertens,* 2001.v.19, p.1341–1342.
- WHEELER, D. S.; WONG, H. R. The Impact of molecular biology on the practice of pediatric critical care medicine. *Pediatric Crit Car Med.* V2(4) p. 299-310, 2001.
- WHITTON, M. E.; PINART, M.; BATCHELOR, J.; LEONARDI-BEE, J.; GONZÁLEZ, U.; JIYAD, Z, ELEFThERIADOU, V.; EZZEDINE, K. Interventions for vitiligo. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015.

\*\*\*\*\*