

Monitoreo de la actividad depigmentante de la idebenona

Screening of depigmenting activity of idebenone

M. Laguens¹, G. Zeitune², M. Reigosa³, J. Cebrián⁴, V. Labarta³, N. Almiñana⁴

¹Cátedra de Patología B. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. ²Creactivar SA. Buenos Aires. Argentina.
³CONICET-CIC (PBA). La Plata. Argentina. ⁴Lipotec SA. Gavá. Barcelona. España.

Correspondencia:

Martín Laguens
Av. del Libertador 4681
(1426) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina
Tel./fax: 54-221-4801509
e-mail: mlaguens@laguens.com.ar

Resumen

Introducción: Existen numerosos compuestos que presentan capacidad depigmentante, pero su uso presenta ciertos riesgos de toxicidad local y eventualmente sistémica, por lo que se hace necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas para desórdenes de la pigmentación o nuevos agentes blanqueadores. Una de estas alternativas puede ser la idebenona, una análogo sintético de la coenzima Q10.

Con el objeto de evaluar la capacidad de la idebenona de inhibir específicamente la síntesis de melanina, se realizó el siguiente experimento:

Materiales y método: Se utilizó una línea celular continua obtenida de melanoma humano (SK-MEL28) con capacidad de síntesis de melanina, la que se expuso a diferentes concentraciones de idebenona durante 5 días. Al cabo de este tiempo se midieron las densidades ópticas de los sobrenadantes con un espectrofotómetro, determinándose así la concentración de melanina y la viabilidad celular, expresándose los resultados como un porcentaje de cultivos controles sin tratar. Como control comparativo se corrieron experimentos en paralelo utilizando hidroquinona.

Resultados: La idebenona inhibe la síntesis de melanina en células SK-MEL28 en forma dosis-dependiente, siendo esta inhibición mayor que la producida por la hidroquinona, pero con menos efectos citotóxicos.

Comentario: La idebenona presenta cierta analogía estructural con compuestos inhibidores de la melanogénesis. Esta analogía podría interferir con la actividad de tirosinasa necesaria para la producción de melanina. La alta seguridad de la droga y la eficacia demostrada aquí podrían poner a la idebenona entre las moléculas de primera línea para el tratamiento de los desórdenes de la pigmentación como también como agente blanqueador.

(M. Laguens, G. Zeitune, M. Reigosa, J. Cebrián, V. Labarta, N. Almiñana. Monitoreo de la actividad depigmentante de la idebenona. *Med Cutan Iber Lat Am* 2008;36:183-183)

Palabras clave: melasma, agente depigmentante, idebenona.

Summary

Introduction: Various agents exhibit a depigmenting activity, but their usage presents some risk of local and eventually systemic toxicity; thus, new alternatives for pigmentation disorders and bleaching agents are continuously searching. One of these alternatives could be idebenone, a synthetic analogue to coenzyme Q10.

In order to test idebenone capability to specifically inhibit melanin synthesis, the following experiment was performed:

Material and methods: A continuous cell line of human origin (SK-MEL28) with melanin synthesis capability was exposed for 5 days to different concentrations of idebenone. After 5 days, optical densities in supernatants were measured by means of an spectrophotometer in order to evaluate melanin content and cell viability. Results were expressed as a percentage of non-treated cell cultures. As a comparative control, similar experiments were performed using hydroquinone.

Results: Idebenone inhibits melanin synthesis in SK-MEL28 cells in a dose-dependent manner, being this inhibition stronger than that produced by hydroquinone, but with lesser cytotoxic effects.

Comment: Idebenone shows structural analogies with other melanogenesis inhibitor compounds. This analogy could, in some way, interfere with tyrosinase activity to produce melanin. The high safety of the drug and the efficacy demonstrated herein could put idebenone in the first choice line either for the treatment of pigmentation disorders as well as a bleaching agent.

Key words: melasma, depigmentint agents, idebenona.

La melanina de la piel y de los pelos es sintetizada por melanocitos epidérmicos a través de la conversión enzimática de la tirosina en estructuras intracelulares denominadas melenosomas que son subsecuentemente transferidos a los queratinocitos vecinos que conforman la epidermis o las estructuras pilosas.

La principal enzima involucrada en el proceso de melanogénesis es la tirosinasa, una hidroxilasa de tirosina que convierte a ésta en di-hidroxifenilalanina (DOPA) y dopaquinona durante los primeros pasos de la síntesis de melanina.

Los desórdenes de la pigmentación incluyen a un grupo de entidades caracterizadas por la pérdida del color cutáneo en forma universal o en un área determinada de la superficie cutánea, como así también a otro grupo de desórdenes caracterizados por un incremento de la pigmentación, también de distribución universal o focal. Dentro del primer grupo se incluye, por ejemplo, al albinismo, un desorden producido por un déficit genético de tirosinasa, al vitíligo, un desorden cutáneo debido a la pérdida de melanocitos epidérmicos, y varios otros más.

Entre los desórdenes caracterizados por hiperpigmentación se pueden nombrar a la hiperpigmentación universal causada por un incremento en hormonas polipeptídicas con actividad estimuladora de melanocitos tales como la ACTH, aumentada en algunas formas de enfermedad de Addison, al melasma, un desorden de la pigmentación relacionado con la gestación en mujeres susceptibles, a la hiperpigmentación post-inflamatoria y a varias entidades más. Es abundante la información sobre estos y otros desórdenes como así también sobre la biología de los melanocitos y la síntesis de melanina, la que puede ser consultada en numerosos textos.

La consulta por desórdenes de la pigmentación es frecuente, sobre todo por vitíligo o melasma, pero también se generan consultas por otros desórdenes o modificaciones de la pigmentación. De hecho, muchos pacientes extremadamente bronceados u otros con piel oscura, pero sin alteraciones de la pigmentación, concurren al médico para disminuir el color de su piel debido a una necesidad de mayor aceptación social[1]. Esto es particularmente frecuente entre personas provenientes de Asia Menor y Cercano Oriente.

Existe una amplia disponibilidad de terapias farmacológicas para el tratamiento de las alteraciones de la pigmentación, siendo los compuestos más comunes los que incluyen a la hidroquinona (HQ) y al éter monobenceno, un compuesto químicamente relacionado. Estos principios activos presentan en común un residuo fenólico al que se le atribuye el efecto farmacológico debido a su acción citotóxica sobre los melanocitos epidérmicos. Desde hace más de 20 años, se han venido desarrollando una serie de compuestos fenólicos con actividad sobre la melanogénesis, siendo un

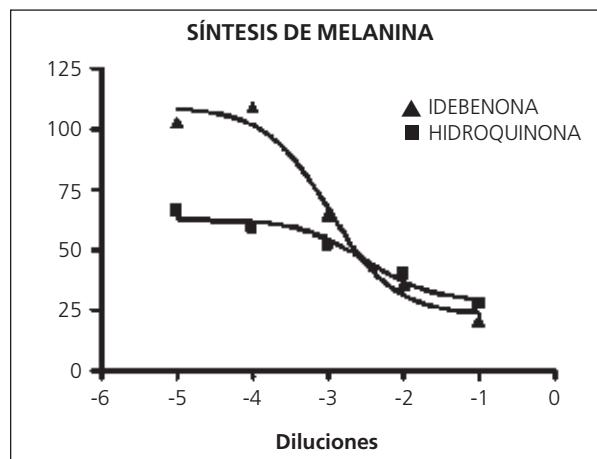


Figura 1. Porcentaje de melanina detectada en los cultivos celulares luego de 5 días de tratamiento con diferentes concentraciones de IDB o HQ, comparado con los controles.

ejemplo de éstos el agente fenólico arbutina, un glucoconjugado de la HQ, al que se le atribuyen funciones inhibitorias competitivas sobre la tirosinasa[2].

A pesar que la HQ y otros compuestos relacionados son usados ampliamente en todo el mundo[3-10], los efectos adversos no son mínimos. El uso prolongado de HQ tópica puede llevar a una hipopigmentación irreversible similar al vitíligo, y el uso habitual puede provocar irritación cutánea. Más aún, en un reciente comunicado de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), se advierte sobre el potencial efecto mutagénico y carcinogénico de la HQ aplicada tópicamente, lo que generó una serie de rígidas normas regulatorias para este producto. Hoy, los dermatólogos necesitan agentes seguros y eficaces alternativos para regular la melanogénesis.

Por otro lado, los efectos citotóxicos de la HQ han llevado al desarrollo de terapias tópicas para el melanoma. Los resultados *in vitro* usando a la HQ como un agente anti-melanoma han mostrado resultados prometedores, pero aún falta recorrer un gran camino antes de que esta droga pueda ser una elección en el tratamiento del melanoma[11].

En este sentido, un grupo de investigadores han desarrollado un sistema de cultivo celular *in vitro* para identificar inhibidores de la síntesis de melanina y potenciales compuestos citotóxicos anti-melanoma como un sistema primario de screening para estos agentes. Este sistema de paneo utiliza una línea celular inmortalizada de origen melanocítico que produce importantes cantidades de melanina. A través de técnicas espectrofotométricas se pueden monitorear fácilmente la habilidad de diversos compuestos de inhibir la pigmentación y/o matar a este tipo celular. Con este método,

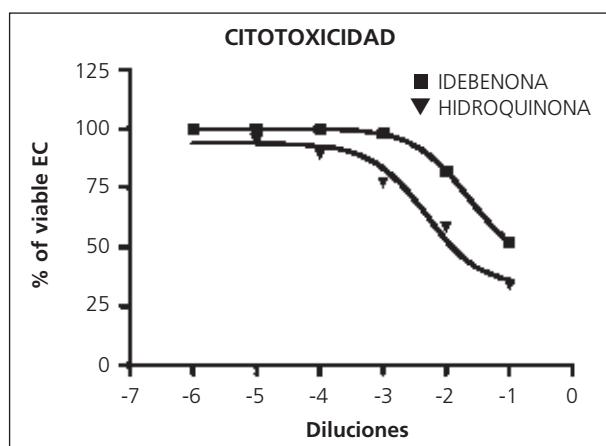


Figura 2. Porcentaje de viabilidad celular en cultivos luego de 5 días de tratamiento con diferentes concentraciones de IDB o HQ, comparado con controles.

los autores han monitoreado 50 compuestos fenólicos de bajo peso molecular[12].

La idebenona (6-(10-hidroxidecil)-2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona) (IDB) es un análogo sintético de la coenzima Q10, que presenta importantes propiedades antioxidantes y un efecto citoprotector. Estas acciones farmacológicas son la causa de su uso como agente neuroprotector. La IDB es administrada oralmente a pacientes con alteraciones de la función neuronal, tales como la observada en la enfermedad de Alzheimer y otros desórdenes similares[13-16]; otras indicaciones incluyen la ataxia de Friederich y el AMES[17-20], y se ha intentado administrar la IDB por vía percutánea[21]. La IDB es altamente liposoluble y puede ser fácilmente absorbida a través de la piel. Algunos investigadores han propuesto usar la IDB tópica como un agente antioxidante cutáneo[22].

Nuestros observaciones preliminares indican que la IDB aplicada tópicamente para el tratamiento de formas leves a moderadas de psoriasis produce un efecto depigmentante en las áreas de piel normal vecinas a las áreas tratadas.

Ya que la IDB comparte similitudes estructurales con varios compuestos fenólicos y con algunos intermediarios en la vía biosintética de la melanina que son exclusivos de los melanocitos, se realizaron pruebas de laboratorio para determinar la existente de efectos inhibitorios de la melanina utilizando un modelo experimental similar al descrito por Dooley et al.[12].

Materiales y método

Línea celular: Se utilizó la línea SK-MEL-28. Esta es una línea celular derivada de un melanoma humano con capacidad

de producir melanina, obtenida de ATCC a través de ABAC (Asociación Banco Argentino de Células). Las células se cultivaron en botellas o placas plásticas de cultivo Corning en medio de cultivo Eagle modificado (Dulbecco) enriquecido con suero bovino fetal al 10% a 37 °C en una atmósfera de CO₂. Cuando se alcanza la confluencia de las células, se obtiene su máxima pigmentación.

Compuestos evaluados: Hidroquinona (1,4-bencenediol) (HQ) con un grado de pureza de 99,85% e IDB con un grado de pureza de 99,8% fueron adquiridas comercialmente en droguería Saporiti, Buenos Aires, Argentina.

Evaluación de los compuestos in vitro: Una vez confluentes, los cultivos fueron lavados dos veces con buffer fosfato salino (PBS) y removidos de las botellas utilizando una solución de tripsina al 0,25%. Las células se sembraron en placas de cultivo plásticas Corning de 24 fosos a una densidad final de 1×10^5 células/foso y se cultivaron por 48 horas más, cambiando el medio de cultivo a las 24 horas. Luego de este tiempo, el medio fue reemplazado en cada foso con 990 ml de medio fresco y 10 ml de un vehículo (propilenglicol:etanol:agua 50:30:20) esterilizado por filtración a través de una membrana de 0,22 mm, conteniendo los compuestos a evaluar en diferentes concentraciones. Se prepararon diluciones de base 10 de cada compuesto utilizando el vehículo descrito, de manera tal de producir concentraciones finales de cada agente en el medio de cultivo que disminuían desde 1,0 a 0,001 mg/ml. El medio de cultivo con el vehículo y los activos se cambió diariamente por 3 días, dejando los cultivos sin tratamiento el día 4, aunque no se removió el medio de cultivo. De esta manera, las células fueron expuestas a los compuestos a evaluar por 5 días consecutivos. Todas las concentraciones de HQ o IDB fueron evaluadas por triplicado y los promedios de 3 fosos tratados fueron comparados con los promedios de los 3 fosos tratados con vehículo sin activo, utilizados como control. En el día 5 post-tratamiento, se realizaron las siguientes evaluaciones:

Determinación del contenido de melanina: Luego del tratamiento, las células SK-MEL-28 fueron lavadas dos veces con PBS y luego lisadas mediante la adición a cada foso de 1,0 ml de NaOH 1 N, con pipeteo manual enérgico. Para determinar el contenido de melanina, se midieron las densidades ópticas de los extractos celulares crudos así obtenidos usando un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 400 nm. Los resultados, expresados como el promedio de 3 muestras, fueron expresados como el porcentaje con respecto al control conformado por los cultivos de células SK-MEL-28 tratados sólo con el vehículo.

Determinación del contenido de dopacromo: Para determinar el contenido de dopacromo, los mismos extractos celulares crudos fueron analizados usando un espectrofotóme-

Tabla 1. Determinación del contenido de melanina (D_0_{400}) y dopacromo (D_0_{475}) en cultivos de células SK-MEL 28 tratados con diferentes concentraciones de hidroquinona e idebenona

| HIDROQUINONA | | | | |
|---------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| Dilución | D_0_{400} | Porcentaje | D_0_{475} | Porcentaje |
| -1 | 0,0066 | 27,97% | 0,0011 | 9,48% |
| -2 | 0,0096 | 40,68% | 0,0016 | 13,79% |
| -3 | 0,0123 | 52,12% | 0,0043 | 37,07% |
| -4 | 0,0140 | 59,32% | 0,0053 | 45,69% |
| -5 | 0,0156 | 66,10% | 0,0040 | 34,48% |
| control | 0,0236 | 100% | 0,0116 | 100% |
| IDEBENONA | | | | |
| Dilución | D_0_{400} | Porcentaje | D_0_{475} | Porcentaje |
| -2 | 0,0069 | 20,91% | 0,0001 | 0% |
| -3 | 0,0119 | 36,06% | 0,0013 | 7,97% |
| -4 | 0,0211 | 63,94% | 0,0083 | 50,92% |
| -5 | 0,0360 | 109,09% | 0,0163 | 100% |
| -6 | 0,0340 | 103,03% | 0,0163 | 100% |
| control | 0,0330 | 100% | 0,0163 | 100% |

tro ajustado a una longitud de onda de 475 nm y los resultados fueron expresados de la misma manera ya descrita.

Cuantificación del número celular: Para cuantificar el número de células de cada cultivo se siguió lo descrito por Dooley et al.[12]. Luego del período de tratamiento, se removieron los medios de cultivo por inversión de las placas y se los reemplazó con 0,5 ml por foso de una solución de cristal violeta 0,1% en etanol al 10%. Las placas fueron colocadas sobre un agitador rotativo funcionando a baja velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se decantó el exceso de colorante por inversión de las placas y se lavaron las mismas 4 veces, mediante su inmersión en contenedores con agua. Luego de los enjuagues, las placas fueron colocadas en forma invertida sobre papel secante para remover el exceso de agua.

Una vez secas las placas, se extrajo el colorante retenido por las células adheridas al plástico mediante el agregado a cada foso de 1,0 ml de etanol 95%, dejando actuar por 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador rotativo. Se determinaron las densidades ópticas de las muestras de 1,0 ml de etanol mediante un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 590 nm, usando etanol 95% como blanco. Si las densidades eran muy altas (por ejemplo, lectura de D0590 mayor a 2.0), se realizaron diluciones de cada muestra del colorante extraído, usando alcohol 95% como diluyente.

Para determinar la fracción de células supervivientes al tratamiento en una determinada concentración de HQ o IDB, se dividieron las D0590 de los fosos tratados (expresadas como promedio de 3 fosos) por la D0590 promedio de 3 fosos control tratados con vehículo solamente. El porcentaje

de sobrevida celular fue obtenido multiplicando el resultado de la división por 100. Los errores estándares del promedio fueron consistentemente mínimos.

Resultados

Determinación del contenido de melanina: Como se puede apreciar en la Tabla 1, tanto la HQ como la IDB inhiben la producción de melanina luego de 5 días de tratamiento. La inhibición fue directamente proporcional a la concentración del agente, de manera tal que a mayor la concentración mayor la inhibición. Cuando se la comparó con HQ, la inhibición por IDB fue similar en concentraciones altas, aunque más pronunciada con HQ. Sin embargo, a concentraciones bajas, la IDB aún presentaba un efecto inhibidor, mientras que la HQ ya no lo presentaba.

Determinación del contenido de dopacromo: Como se aprecia en la Tabla 1, el tratamiento con IDB o HQ produjo cambios en el contenido de dopacromo de las células SK-MEL-28, aunque los resultados fueron erráticos, no mostrando una clara relación con la dosis utilizada. El tratamiento con IDB produjo un efecto inhibitorio más pronunciado que la HQ a concentraciones similares.

Los resultados se resumen en la Figura 1.

Viabilidad celular: En la Tabla 2 se pueden observar los resultados de esta determinación. Como se puede observar, las concentraciones altas de IDB son tóxicas para las células SK-MEL-28, aunque esta toxicidad es menos pronunciada que la obtenida con HQ. Los resultados se resumen en la Figura 2.

Tabla 2. Porcentajes de sobrevida de células SK-MEL 28 con respecto a los controles, cuando son tratados por 5 días con diferentes concentraciones de idebenona e hidroquinona

| IDEBENONA | | HIDROQUINONA | |
|-----------|------------|--------------|------------|
| Dilución | Porcentaje | Dilución | Porcentaje |
| -1 | 52% | -1 | 34% |
| -2 | 82% | -2 | 58% |
| -3 | 98% | -3 | 77% |
| -4 | 100% | -4 | 89% |
| -5 | 100% | -5 | 95% |
| -6 | 100% | -6 | 100% |
| control | 100% | control | 100% |

Comentario

Utilizando, con mínimas e irrelevantes modificaciones, el ensayo *in vitro* sobre cultivos celulares desarrollado por Dooley et al., para el monitoreo de agentes biológicos y químicos capaces de inhibir la melanogénesis y causar la muerte celular de melanocitos, neoplásicos o no, encontramos que la IDB es claramente un potente inhibidor de la síntesis de melanina, inclusive a dosis bajas, sin efectos citotóxicos, lo que hace a la IDB un buen candidato como agente depigmentante o blanqueador. IDB es una droga suficientemente segura, inclusive cuando se administra por vía oral a altas dosis[23]. La administración transdérmica de IDB ya fue probada como una potencial vía de administración de la droga para el tratamiento de desórdenes internos. Esta seguridad y eficacia demostrada aquí pueden poner a la IDB en la primera línea de elección para el tratamiento de desórdenes de la pigmentación, reemplazando a la HQ debido a la falta de efectos indeseables tales como ocronosis o inclusive, el desarrollo de melanoma cutáneo[24-28].

Otras moléculas que también podrían cubrir este uso potencial incluyen al metil-éster del ácido gentísico, que en el trabajo de Dooley mostró alta capacidad de inducir depigmentación sin efectos citotóxicos[12], o la arbutina[2], feldamicina (un inhibidor de la tirosinasa[29], y altas concentraciones de glutatión[30], pero previamente, deberían ser obtenidos más datos sobre su seguridad.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la IDB produce efectos citotóxicos discretos sobre este sistema celular evaluado. Esta citotoxicidad podría deberse a otras causas aparte de una interferencia con algunas vías metabólicas celulares, tales como la osmolaridad, aunque datos no presentados en este trabajo muestran que la IDB a concentraciones similares no es citotóxica para otra línea celular continua no productora de melanina (Vero). Estos resultados permiten *a priori* descartar un efecto citopático directo de la IDB atribuible a su concentración, señalando hacia una

acción inhibitoria concreta de la proliferación celular de esta droga, lo que podría ser de interés si este efecto acontece sobre células de un melanoma. Sin embargo, la HQ parece ser más potente que la IDB en la producción de este efecto. Más aún, el efecto inhibitorio de la HQ sobre la síntesis de melanina podría ser debido a su potencia citotóxico más que a una inhibición verdadera.

Los resultados de las determinaciones de dopacromo se asemejan a lo registrado para la inhibición de melanina, aunque el contenido de este metabolito parece ser menor que la correspondiente concentración de melanina a una misma dilución. Esto podría reflejar una inhibición de la síntesis de melanina en sus estadios iniciales, que impediría que las primeras sustancias oxidadas de esta vía sean vueltas a oxidar por la tirosinasa. Esto podría ser debido, entre otras cosas, a una inhibición enzimática por sustancias de desecho acumuladas dentro del citoplasma, como se conoce que ocurre con la inhibición de la tirosinasa por productos intermedios de la biosíntesis de la melanina.

Podría especularse que el efecto inhibitorio de la IDB se debería a su analogía estructural con la dopaquinona, la que es producida por la oxidación enzimática de DOPA por la tirosinasa. La IDB puede ser considerada como una para-quinona sustituida, y más precisamente, una 1,4-benzoquinona sustituida. Esta analogía estructural no es exacta, ya que la dopaquinona y otras quinonas que participan en la vía biosintética de la melanina son orto-quinonas, mientras que la IDB es una p-quinona, pero, incidentalmente, el producto de oxidación de la hidroquinona es una p-quinona[12]. En el trabajo de Dooley et al., se probaron como potenciales reguladores de la pigmentación a diferentes 1,4-benzoquinonas comercialmente disponibles, con diferentes sustituciones en distintas posiciones en el anillo quinónico[12]. Todas ellas, con excepción de un compuesto halogenado, mostraron una alta citotoxicidad, siendo descartadas como potenciales agentes depigmentantes.

Bibliografía

1. Mahe A, Ly F, Aymard G, Dangou J. Skin diseases associated with the cosmetic use of depigmenting products in women from Dakar, Senegal. *Br J Dermatol* 2003;148:493-500.
2. Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, Fukuda M. Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis: Biochemical study on cultured ME-6 melanoma cells ad effect on the UV-induced pigmentation in human skin. *Proc Jpn Soc Invest Dermatol* 1988;12: 138-9.
3. Yoshimura K, Harii K, Aoyama T, Iga T. Experience with a strong depigmenting treatment for skin hyperpigmentation in Orientals. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:1097-108.
4. Yoshimura K, Harii K, Aoyama T, Iga T. A new depigmenting protocol for hyperpigmented skin lesions with a high concentration of all-trans retinoic acid aqueous gel. *Aesthetic Plast Surg* 1999;23:285-91.
5. Clarys P, Barel A. Efficacy of topical treatment of pigmentation skin disorders with plant hydroquinone glucosides as assessed by quantitative color analysis. *J Dermatol* 1998;25:412-4.
6. Kang W, Chun S, Lee S. Intermittent therapy for melasma in Asian patients with combined topical agents (retinoic acid, hydroquinone and hydrocortisone): clinical and histological studies. *J Dermatol* 1998;25:587-96.
7. Tung R, Bergfeld W, Vidimos A, Remzi B. alpha-Hidroxy acid-based cosmetic procedures. Guidelines for patient management. *Am J Clin Dermatol* 2000;18:81-8.
8. Grimes P. Melasma: etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995;131:1453-7.
9. Jimbow K. Vitiligo: therapeutic advances. *Dermatol Clin* 1998;16:399-407.
10. Wester R, Melendres J, Hui X, Cox R, Serranzana S, Zhai H, Quan D et al. Human in vivo and *in vitro* hydroquinone topical bioavailability, metabolism and disposition. *J Toxicol Environ Health A* 1998;54:301-17.
11. Jimbow K, Miura S, Ito Y, Kasuga T, Ito S. Utilization of melanin precursors for experimental chemotherapy of malignant melanoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1984;11:2125-32.
12. Dooley T, Godwood R, Kilgore T, Thomasco L. Development of an *in vitro* primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents. *Skin Pharmacol* 1994;7:188-200.
13. Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity *in vivo*. *Eur J Neurosci* 1999;11:83-90.
14. Weyer G, Babej-Dolle RM, Hadler D, Hofmann S, Herrmann WM. A controlled study of 2 doses of idebenone in the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology* 1997;36:73-82.
15. Yamada K, Nitta A, Hasegawa T, Fuji K, Hiramatsu M, Kameyama T, Furukawa Y, et al. Orally active NGF synthesis stimulators: potential therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 1997;83:117-22.
16. Bergamasco B, Scarzella L, La Commare P. Idebenone, a new drug in the treatment of cognitive impairment in patients with dementia of the Alzheimer type. *Funct Neurol* 1994;9:161-8.
17. Schulz JB, Dehmer T, Schols L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, Bürk K et al. Oxidative stress in patients with Friedreich's ataxia. *Neurology* 2000;55:1719-21.
18. Rustin P, Von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rotig A. Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 1999;354:4777-9.
19. Ikejiri Y, Mori E, Ishii K, Yasuda M, Sasaki M. Idebenone improves cerebral mitochondrial oxidative metabolism in a patient with MELAS. *Neurology* 1996;47:583-5.
20. Pisano P. Plasma concentrations and pharmacokinetics of idebenone and its metabolites following single and repeated doses in young patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Eur J Pharmacol* 1996;31:167-9.
21. Yasutaka I, Yasuyuki S, Shigeru T. Idebenone-containing preparation for percutaneous administration. World Patent Number: WO9907355. Publication date 1999-02-18.
22. Neudecker B, Weiland E, Diedrich F. Topically applied idebenone-containing agent with protective and regenerative effect. US Patent Number US6756045.
23. Guttmann H, Hadler D. Sustained efficacy and safety of idebenone in the treatment of Alzheimer's disease: update on a 2-year double-blind multicentre study. *J Neural Transm Suppl* 1998;54:301-10.
24. Nielsen H, Henriksen L, Olsen J. Malignant melanoma among lithographers. *Scand J Work Environ Health* 1996;22:108-11.
25. Levin C, Maibach H. Exogenous ochronosis. An update on clinical features causative agents and treatment options. *Am J Clin Dermatol* 2001;2:213-7.
26. Lawrence N, Bligard C, Reed R, Perret W. Exogenous ochronosis in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1988;18:1027-11.
27. Hoshaw R, Zimmerman K, Menter A. Ochronosis-like pigmentation from hydroquinone depigmenting creams in American blacks. *Arch Dermatol* 1985;12:105-8.
28. Findlay G, Morrison J, Simson I. Exogenous ochronosis and pigmented colloid milium from hydroquinone depigmenting creams. *Br J Dermatol* 1975;9:613-22.
29. Terao M, Tomita E, Oki T, Tabe L, Gianni M, Garattini E. Inhibition of melanogenesis by BMY-28565, a novel compound depressing tyrosinase activity in B-15 melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 1992;43:183-9.
30. Imekawa G. Analysis of initial melanogenesis including tyrosinase transfer and melanosome differentiation through interrupted melanization by glutathione. *J Invest Dermatol* 1989;93:100-7.