CARLOS BAPTISTA BARCAUI

**Células-tronco foliculares na alopecia difusa
não-cicatricial de pacientes HIV positivos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Dermatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirian Nacagami Sotto

**São Paulo
2005**

À Julia e Clara, minhas células-filhas.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Mírian Nacagami Sotto, por ter acreditado em nossa proposta e pela sua disponibilidade e dedicação com que conduziu este trabalho.

À bióloga Ana Maria Gonçalves da Silva pelo seu esmero no preparo das reações imunohistoquímicas.

À técnica Cristina Galhardo pelo auxílio dado no preparo dos cortes histológicos.

Ao colega e ex-aluno Leonardo Zacharias Gonçalves pela sua ajuda na triagem dos pacientes investigados.

Ao amigo Bernd Genser pelas suas orientações na elaboração de nossa análise estatística.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (472715/2003-8 e 504726/2003-0) pelo investimento financeiro em nossa pesquisa.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Lista de figuras	
	Lista de siglas	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Summary	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1	Alopecia na infecção pelo HIV.....	4
3.2	Células -tronco no epitélio folicular.....	6
3.3	Protuberância folicular nas alopecias.....	15
3.3.1	Alopecia da doença enxerto <i>versus</i> hospedeiro.....	15
3.3.2	Liquen plano pilar.....	16
3.3.3	Alopecia no lupus eritematoso discóide.....	17
3.3.4	Alopecia areata.....	17
3.3.5	Alopecia androgenética.....	17
3.3.6	Foliculite de células-tronco.....	19
3.4	Apoptose.....	19
3.4.1	Controle da apoptose.....	21
3.4.2	Alterações das moléculas controladoras da apoptose na infecção pelo HIV.....	24
3.4.3	Apoptose e auto-imunidade.....	24
3.4.4	Auto-imunidade e infecção pelo HIV.....	25
3.5	Cinética tecidual da epiderme e do folículo pilo-sebáceo. Equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular.....	26
4	MÉTODOS.....	30
4.1	Casuística.....	30
4.2	Análise Histológica.....	35

4.3	Demonstração de apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular.....	36
4.4	Correlação da incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, com o grau de imunodeficiência.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Análise histopatológica	45
5.2	Demonstração de apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular.....	49
5.3	Correlação da incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, com o grau de imunodeficiência.....	57
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÕES	71
8	ANEXO.....	72
9	REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Teoria da ativação das células da protuberância.....	11
Figura 2	Representação esquemática da unidade epidermo-pilo-sebácea.....	14
Figura 3	Alopecia difusa não cicatricial de paciente HIV-1 positivo. Aspecto clínico da observação 9. Rarefação capilar difusa na região frontal.....	32
Figura 4	Alopecia difusa não cicatricial de paciente HIV-1 positivo. Aspecto clínico da observação 9. Paciente queixava-se de alteração do volume e da textura capilar; região temporal esquerda.....	32
Figura 5	Representação esquemática da clivagem do material.....	34
Figura 6	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 13). Corte transversal de couro cabeludo ao nível da inserção do músculo eretor do pêlo. Observa-se desorganização das fibras colágenas perifoliculares (→). (Tricrômico de Gomori; aumento original x40).....	46
Figura 7	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 6). Corte transversal de couro cabeludo ao nível da inserção do músculo eretor do pêlo. Observa-se o aumento do número de folículos telógenos e de unidades telógenas germinativas (→). (Tricrômico de Gomori; aumento original x40).....	46

Figura 8	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 6). Detalhe da desintegração da bainha de mielina de um folículo telógeno. (Tricrômico de Gomori; aumento original x100).....	50
Figura 9	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 12). Corte transversal de couro cabeludo. Observa-se dupla marcação CK19 (BCIP/NBT, azul) e TUNEL (DAB, marrom) em células da bainha radicular externa de dois folículos pilosos (→); (aumento original x100).....	51
Figura 10	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 12). Detalhe da dupla marcação CK19/TUNEL de células da bainha radicular externa de folículo piloso; (aumento original x400).....	51
Figura 11	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 12). Corte transversal de folículo piloso exibindo células CK19 (BCIP/NBT, azul) e TUNEL (DAB, marrom) positivas na bainha radicular externa ao nível da protuberância folicular; (aumento original x1000).....	52
Figura 12	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 6). Corte transversal de couro cabeludo. Presença células CK19+ apoptóticas (TUNEL positivas) na bainha radicular externa que delimitam as projeções epiteliais características da protuberância folicular; (aumentmo original x400).....	52
Figura 13	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 5). Detalhe da bainha radicular externa de um folículo piloso exibindo queratinócitos apoptóticos (núcleos TUNEL positivos – DAB, marrom) que não expressam CK 19 no citoplasma (→) e células da camada basal com dupla marcação; (aumento original x1000).....	53
Figura 14	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 1). Corte transversal de folículo piloso exibindo células com dupla marcação CK19 (BCIP/NBT, azul) e TUNEL (DAB, marrom)	

	em toda a circunferência da bainha radicular externa de folículo piloso; (aumento original x400).....	53
Figura 15	Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 1). Corte transversal de couro cabeludo ao nível da protuberância. Observa-se queratinócitos apoptóticos (→) na bainha radicular externa, evidenciados pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada; (aumento original x400).....	54

LISTA DE SIGLAS

ADNC	alopecia difusa não cicatricial
3HT	timidina tritiada
AAG	alopecia androgenética
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
Apaf	fator ativador da protease apoptótica
BCIP/NBT	<i>nitro blue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-cloro-3 indoyl phosphate, toluidine salt</i>
BRE	bainha radicular externa
BRI	bainha radicular interna
BSA	soro-albumina bovina
CAD	DNase ativada por caspase
CK19	anticorpo monoclonal anti-citoqueratina 19
DEVH	doença enxerto <i>versus</i> hospedeiro
DISC	complexo sinalizador indutor de morte
DP	desvio padrão
FADD	domínio mortal associado ao Fas
Fas/Fas	antígeno Fas e ligante do antígeno Fas
Fas/Apo	receptor de apoptose do antígeno Fas
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FLIP	proteína celular inibitória FLICE-símile
FPS	folículo pilo-sebáceo
HAART	terapia anti-retroviral altamente agressiva
HIAP	proteína inibidora da apoptose H
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
IAP	proteínas inibidoras de apoptose
ICAM	molécula de adesão intercelular
ICE/ced	enzima conversora de interleucina 1 β /gene relacionado à morte celular

IGF	fator de crescimento insulina-símile
MEP	músculo eretor do pêlo
PARP	poli ADP-ribose polimerase
PBS	solução salina tamponada com fosfato
P75NTR	receptor de neurotrofinas de baixa atividade subunidade 75
PTHrp	proteína relacionada ao hormônio similar ao da paratireóide
TAC	células amplificadoras transitórias
TFR	tratos fibrosos residuais
TGF	fator de crescimento transformador
TGU	unidades telógenas germinativas
TNF	fator de necrose tumoral
TRADD	domínio mortal associado ao TNF
TRAIL/APO	ligante indutor de apoptose relacionada com TNF
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyltransferase d-UTP fluorescein nick-end labeling</i>
XIAP	proteína inibidora da apoptose X

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, quanto ao sexo, idade, nível de células CD4+ no sangue, data da confirmação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e drogas em uso na ocasião do estudo.....	31
Tabela 2	Grupo controle – dados de sexo e idade dos indivíduos hígidos não alopecicos.....	33
Tabela 3	Resultados da análise histopatológica / morfométrica nos pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial (casos).....	47
Tabela 4	Resultados da análise histopatológica / morfométrica de couro cabeludo de indivíduos hígidos sem alopecia (controles).....	48
Tabela 5	Apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular, evidenciada pela técnica de dupla marcação TUNEL/CK19 e pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada, na alopecia difusa não cicatricial de pacientes HIV-1 positivos.....	55
Tabela 6	Apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular evidenciada pela técnica de dupla marcação TUNEL/CK19 e pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada em grupo controle de couro cabeludo normal.....	56

Tabela 7 Correlação da incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, com o nível de células CD4+ apresentado pelos pacientes.....	57
---	----

RESUMO

Barcaui CB. Células-tronco foliculares na alopecia difusa não-cicatricial de pacientes HIV positivos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 89p.

INTRODUÇÃO: Aproximadamente 7% dos pacientes HIV positivos apresentam alopecia difusa não-cicatricial (ADNC), principalmente nos estágios mais avançados da doença. Neste trabalho analisou-se as alterações histológicas encontradas em cortes transversais de couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com ADNC, constatou-se a ocorrência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular e comparou-se sua incidência com a de couro cabeludo de indivíduos hígidos. Observou-se se houve correlação da frequência de apoptose com o grau de imunodeficiência apresentado por esses pacientes. **MÉTODOS:** Fez-se estudo de tipo caso-controle para comparar os achados histológicos e frequência de apoptose de células tronco foliculares e células amplificadoras transitórias, da protuberância folicular, através de técnica de dupla marcação com anticorpo anti-citoqueratina 19/TUNEL e técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti-caspase 3 clivada, em cortes transversais de couro cabeludo de 15 pacientes HIV-1 positivos com ADNC e de 12 controles sadios. Verificou-se se havia correlação entre a frequência de apoptose, na protuberância folicular, com a contagem de linfócitos T CD4+ no sangue dos pacientes, através do teste de correlação de Pearson. **RESULTADOS:** O exame histopatológico demonstrou maior desorganização das fibras colágenas perifoliculares nos casos quando comparados aos controles. A média do número de unidades foliculares foi de 9,2 ($\pm 1,1$) nos casos e de 9,8 ($\pm 1,1$) nos controles. A proporção de folículos telógenos foi maior nos casos (7% $\pm 6\%$) do que nos controles (2% $\pm 12\%$). Não foi observado infiltrado inflamatório perifolicular em nenhum dos casos e controles. Apoptose de células tronco-foliculares e amplificadoras transitórias na protuberância folicular foi demonstrada pela dupla marcação TUNEL/CK19 em 80% dos casos e em 25% dos controles e, pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada em 61% dos casos e 16% dos controles. Não houve correlação entre a frequência de apoptose de células da protuberância folicular e níveis de linfócitos T CD4+ no sangue dos pacientes HIV-1 positivos. **CONCLUSÕES:** O quadro histopatológico da ADNC de pacientes HIV-1 positivos caracterizou-se pela desorganização estrutural das unidades foliculares e maior número de folículos telógenos quando comparado ao couro cabeludo de indivíduos hígidos sem alopecia. Demonstrou-se apoptose de células indiferenciadas pluripotenciais (células tronco e células amplificadoras transitórias) da bainha radicular externa da protuberância folicular na ADNC de pacientes HIV-1 positivos. Entretanto, a apoptose não parece ser resultante de quadro de foliculite citotóxica, uma vez que não foram observadas alterações inflamatórias em todos os casos estudados. O fenômeno da apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais (células-

tronco e células amplificadoras transitórias) presentes na bainha radicular externa, na região da protuberância folicular, foi observado com uma frequência maior na ADNC de pacientes HIV-1 positivos, do que no couro cabeludo de indivíduos hígidos, sem alopecia. A incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais (células-tronco e células amplificadoras transitórias), presentes na região da protuberância folicular, do couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com ADNC, não guardou relação com o grau de imunodepressão desses pacientes.

Descritores: 1.HIV 2.CÉLULAS-TRONCO 3.FOLÍCULO PILOSO
4.ALOPECIA

SUMMARY

Barcaui CB. Hair follicle stem cells in diffuse non-scarring alopecia in HIV positive patients. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 89p.

INTRODUCTION: Approximately 7% of HIV positive patients presents diffuse non-scarring alopecia (DNSA). This kind of alopecia is observed mainly in the late stages of acquired immune deficiency syndrome. This research contains an analysis of the histopathological aspects observed in transverse scalp sections of HIV-1 positive patients with DNSA. The occurrence of apoptosis of the undifferentiated pluripotencial bulge cells was demonstrated and its incidence was compared with a control normal group. It was verified whether there was a correlation between the apoptosis frequency and the immunodeficiency stage of the patients. **METHODS:** A case-control study was performed in order to compare the histopathological aspects and bulge cells apoptosis on the transverse scalp samples of 15 HIV-1 positive patients with DNSA and 12 healthy controls. The apoptosis was demonstrated through immunohistochemical technique using anti-cytokeratin 19/TUNEL double labeling and cleaved caspase 3 antibody. The correlation between the apoptosis frequency and the immunodeficiency stage of the patients was verified through the statistical test of correlation of Pearson. **RESULTS:** The histopathological analysis revealed perifollicular collagen bundles disorganization in DNSA samples. The mean of follicular units in the cases was 9.2 (± 1.1) and, in the controls, 9.8 (± 1.1). The proportion of telogen follicles was higher in cases (7% $\pm$ 6%) than in controls (2% $\pm$ 12%). No perifollicular inflammatory infiltration was observed neither in cases nor in the controls. Hair follicle stem cell and transit amplifying cells apoptosis was demonstrated through double labeling with CK19/TUNEL in 80% of the cases and 25% of the controls, and through the anti-cleaved caspase 3 antibody in 61% of the cases and 16% of the controls. There was no correlation between bulge cell apoptosis and the CD4+ lymphocytes blood levels in the HIV-1 positive patients. **CONCLUSIONS:** Through the case control study performed, it was demonstrated that DNSA in HIV-1 positive patients was characterized by the structural disorganization of the follicular units and a higher number of telogen follicles. Apoptosis of the undifferentiated pluripotencial cells (stem cells and transit amplifying cells) of the outer root sheath at the bulge was demonstrated in DNSA HIV-1 positive patients. Nevertheless, the apoptosis doesn't seem to be related to a cytotoxic folliculitis, since no inflammatory alterations were observed in any of the studied cases. Apoptosis of the undifferentiated pluripotencial cells (stem cells and transit amplifying cells), present at the outer root sheath at the bulge level, proved to be more frequent in DNSA HIV-1 patients than in the scalp of healthy non-alopecic subjects. The incidence of apoptosis of the undifferentiated pluripotencial cells (stem cells and transit amplifying cells) present at the bulge of HIV-1 positive patients with DNSA, showed no correlation with the degree of immunosuppression of the patients.

Key words: 1.HIV 2.STEM CELLS 3.HAIR FOLLICLE 4.ALOPECIA

1. INTRODUÇÃO

Diferentes alterações capilares são relatadas na infecção pelo vírus da imunodeficiência 1 (HIV-1). Em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os cabelos tendem a se tornar mais lisos, finos e descolorados.¹ Apesar de se tratar de um problema eminentemente estético, a alopecia pode afetar a auto-estima do indivíduo e consequentemente suas relações sociais e qualidade de vida.² Estima-se que aproximadamente 7% dos pacientes HIV-1 positivos apresentam alopecia difusa não-cicatricial, principalmente nos estágios mais avançados da doença com níveis baixos de células CD4+.³ Dentre os mecanismos etiopatogênicos envolvidos temos a própria infecção pelo HIV-1, infecções oportunistas, deficiências nutricionais, distúrbios imunológicos, endócrinos e utilização de diversas drogas. Como consequência, há uma interrupção do ciclo folicular seguida de um eflúvio anágeno ou telógeno, dependendo do grau da agressão.

O folículo piloso é um micro-órgão anexo da pele de mamíferos responsável pela produção de pêlos. Diferentemente da epiderme interfolicular, que permanece em constante estado de auto-renovação, o folículo piloso apresenta um comportamento cíclico. Períodos de alta atividade mitótica e de diferenciação celular (fase anágena) são interrompidos por uma fase de remodelação (catágena), seguidos por um período de quiescência (fase telógena) para, em seguida, iniciar novamente seu crescimento. Durante esses três processos evolutivos distintos, um

princípio básico tem que ser respeitado: o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada - apoptose. O balanço desse equilíbrio é a chave para o controle do crescimento e regressão do folículo piloso e é o fator determinante para o tratamento de distúrbios do ciclo folicular.⁴

A apoptose de células-tronco, apesar de parecer paradoxal, é um fenômeno encontrado, de forma fisiológica, em outros tecidos com poder de auto-renovação. No folículo piloso, está correlacionada com o remodelamento estrutural que ocorre durante a fase catágena.⁵ Na alopecia difusa de pacientes HIV-1 positivos, Smith et al.⁶, em 1996, descreveram queratinócitos apoptóticos na protuberância folicular como um achado característico dessa forma de alopecia. Porém, até o momento, nenhum estudo comparativo foi realizado.

Nosso principal objetivo foi constatar a ocorrência de apoptose nas células indiferenciadas (células-tronco e células amplificadoras transitórias) da protuberância folicular em pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial. Através de técnicas de biologia molecular e de imunohistoquímica aplicadas em cortes transversais de couro cabeludo realizamos um estudo caso-controle, no qual comparamos os achados obtidos em 15 pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não-cicatricial e 12 controles hígidos sem alopecia.

2. OBJETIVOS

A - Analisar as alterações histológicas encontradas em cortes transversais de couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial.

B - Constatar a ocorrência do fenômeno da apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais (células-tronco e células amplificadoras transitórias) da protuberância folicular do couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial.

C - Comparar a incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular do couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial e do couro cabeludo de indivíduos hígidos.

D - Correlacionar a incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, com o grau de imunodeficiência apresentado por esses pacientes.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Alopecia na infecção pelo HIV

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode se apresentar com quatro fases distintas em sua evolução: infecção aguda, período assintomático, linfadenopatia persistente generalizada e fase sintomática, que inclui a síndrome da imunodeficiência adquirida. Em todos os estágios da infecção podem ocorrer manifestações dermatológicas, desde a erupção cutânea roseoliforme, vista na infecção aguda até as alterações associadas à imunodeficiência propriamente dita, como infecções oportunistas e o sarcoma de Kaposi. Estas últimas encontradas na fase mais avançada da doença. Assim como a pele, os fâneros também podem apresentar manifestações como a síndrome das unhas amarelas encontrada na pneumocistose, alongamento dos cílios associado ao aumento da prolactina sérica, canície precoce, alopecias e outras.^{7,8}

A adoção de esquemas terapêuticos combinados mais agressivos, a chamada terapia anti-retroviral altamente ativa (“highly active antiretroviral therapy” ou HAART), provocou uma mudança substancial na expectativa e na qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV. As classes de drogas utilizadas compreendem os inibidores da enzima viral protease e os inibidores da enzima transcriptase reversa nucleosídeos, não-nucleosídeos e nucleotídeo. A HAART é capaz de reduzir a replicação viral, elevar o número de células CD4+ e, conseqüentemente, diminuir a prevalência de infecções oportunistas, a taxa de progressão da infecção pelo HIV, o número de

internações e de óbitos.⁹⁻¹² Com o advento da HAART também houve uma significativa mudança na prevalência das doenças cutâneas. O número de infecções oportunistas diminuiu, acompanhado de um aumento das reações alérgicas medicamentosas, principalmente associadas aos inibidores de protease. Curiosamente, a dermatite seborréica também apresentou uma diminuição de sua intensidade e extensão, provavelmente, relacionada com a redução da secreção sebácea e a diminuição da população de *Pityrosporum ovale* ocasionadas pelo efeito retinóide-símile de alguns inibidores de protease. Por outro lado, houve o aumento da incidência de outras manifestações como a lipodistrofia e a lipomatose difusa. Queixas que até então não motivavam o paciente a procurar auxílio médico, como onicodistrofias e alopecias, passaram a constar na lista dos principais motivos de consulta ao dermatologista.¹³

Diferentes alterações capilares são relatadas na infecção pelo HIV. Em pacientes com AIDS, os cabelos tendem a se tornar mais lisos, finos e descolorados.¹ Apesar de se tratar de um problema eminentemente estético, a alopecia pode afetar a auto-estima do indivíduo e, conseqüentemente, suas relações sociais e qualidade de vida.² Estima-se que aproximadamente 7% dos pacientes HIV positivos apresentam alopecia difusa³ principalmente nos estágios mais avançados da doença com níveis baixos de células CD4+.⁷ Dentre os mecanismos etiopatogênicos envolvidos, temos a própria infecção pelo HIV, infecções oportunistas, deficiências nutricionais, distúrbios imunológicos, alterações endócrinas e utilização de diversas drogas. Como consequência, há uma interrupção do ciclo folicular

seguida de um eflúvio anágeno ou telógeno, dependendo do grau da agressão. Outra forma de alopecia relatada em pacientes HIV positivos é a areata, inclusive em sua forma universal.¹³⁻¹⁵ Existem ainda na literatura relatos de alopecia induzida pelos inibidores da protease, em particular o indinavir, cujo mecanismo etiopatogênico parece estar relacionado com os efeitos retinóide-símiles dessa droga.^{16,17}

Smith et al.⁶, em um trabalho envolvendo 10 pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não-cicatricial, relataram a presença de queratinócitos apoptóticos na bainha radicular externa ao nível da protuberância^{18,19} ou bojo²⁰ (bulge), onde estão albergadas as células-tronco foliculares.²¹ Os autores também descreveram infiltração inflamatória perifolicular, leve a moderada, como um achado significativo. Baseados no fato da protuberância também ser o sítio folicular mais acometido na doença enxerto *versus* hospedeiro (DEVH),^{22,23} onde as células-tronco são o principal alvo, os autores levantaram a hipótese de que uma reação auto-imune (DEVH-símile) pudesse ser um dos mecanismos envolvidos na patogênese dos distúrbios causados pelo HIV, incluindo a alopecia.

3.2 Células-tronco do epitélio folicular

A manutenção da homeostase de qualquer tecido com poder de auto-renovação depende da presença e da integridade das células-tronco ou células-mãe. As células-tronco são células progenitoras indiferenciadas tanto bioquímica quanto ultra-estruturalmente. Possuem um alto potencial proliferativo e são capazes de dar origem a todos os elementos de um

determinado tecido (multipotentes).²⁴ São clonogênicas *in vitro* e possuem um ciclo celular longo e lento, provavelmente para conservar seu potencial proliferativo e minimizar as chances de erros de DNA que podem ocorrer durante a replicação.²⁵ Podem ser estimuladas a proliferar em resposta à cicatrização e a fatores de crescimento e, frequentemente, estão localizadas em áreas bem protegidas, bem vascularizadas e inervadas.²⁶

Devido a seu ciclo celular ser lento, a divisão das células-tronco é um evento relativamente raro e muito bem regulado. Em média, uma das duas células-filhas derivadas de sua divisão irá deixar o nicho onde está situada sua progenitora e irá se transformar em uma célula amplificadora, com potencial proliferativo limitado, fadada à diferenciação terminal. As outras células-filhas permanecem indiferenciadas, mantendo assim a fonte para renovação celular do tecido. A multiplicação mitótica das células derivadas da célula-mãe, situadas nos estágios intermediários de maturação, é suficiente para manter o equilíbrio da cinética tecidual normal (crescimento x diferenciação x morte celular), o que justifica o pequeno número de células-tronco encontrado, por exemplo, na medula óssea.²⁷

As células oriundas das células-tronco, ao deixarem o nicho onde se encontram, tornam-se célulasificadoras transitórias (TAC - “transit amplifying cells”). As TAC possuem potencial proliferativo limitado e quando esse potencial se esgota, elas se tornam pós-mitóticas. Existe uma hierarquia entre as TAC, que vai desde a célula jovem capaz de várias divisões, até as células mais maduras, com pouca capacidade de divisão. Devido à dificuldade em se estabelecer um marcador específico para

células-tronco, vários pesquisadores lançaram mão da cinética celular para distinguir as células de ciclo lento (tronco) das TAC, que se proliferam mais frequentemente.^{21,28,29} Essa marcação geralmente é feita com timidina tritiada (3HT) ou bromodeoxi-uridina (BrdU), de forma que as células com ciclo lento retêm a marcação por um período maior (4-8 semanas).

O folículo piloso é um micro-órgão anexo da pele de mamíferos responsável pela produção de pêlos. Diferentemente da epiderme interfolicular, que permanece em constante estado de auto-renovação, o folículo piloso apresenta um comportamento cíclico. Períodos de alta atividade mitótica e de diferenciação celular (fase anágena) são interrompidos por uma fase de remodelação (catágena), seguidos por um período de quiescência (fase telógena) para, em seguida, iniciar novamente seu crescimento.

Um agrupamento de células epiteliais relativamente indiferenciadas, denominadas células matriciais, situadas na base do bulbo folicular foi considerado durante muito tempo como sendo as células-tronco foliculares. A natureza pluripotencial dessa população celular foi atribuída à sua capacidade de originar linhagens celulares distintas (medula, córtex, cutículas, camadas de Huxley e Henle), de acordo com sua diferenciação, durante a fase anágena.³⁰ O papel das células matriciais, como células-tronco foliculares, começou a ser questionado quando foi demonstrado que o bulbo pode ser gerado a partir das células da bainha radicular externa (BRE) folicular, após as células matriciais terem sido totalmente destruídas por raios X.³¹ Oliver et al.^{32,33} e Ibrahim et al.³⁴, demonstraram que vibrissas

de ratos são capazes de se regenerar após a excisão cirúrgica de seus bulbos que contém as células matriciais.

A pesquisa da cinética celular com 3 HT aplicada ao FPS levou, em 1990, à descoberta de que as células retentoras de marcação estão restritas à BRE ao nível da inserção do músculo eretor do pêlo (MEP), em uma região denominada protuberância ou bojo folicular. As células indiferenciadas da protuberância folicular apresentam atributos importantes que as caracterizam como células-tronco: (1) as células das porções superiores do FPS, incluindo a protuberância, apresentam maior capacidade de crescimento *in vitro* quando comparadas com células de outras porções do FPS e da epiderme;^{35,36} (2) as células, normalmente quiescentes da protuberância, atravessam um período transitório de proliferação celular durante o início da fase anágena ou após serem estimuladas (p.ex. por arrancamento da haste pilosa, pela ação de ácido retinóico e forbol éster), dando origem as TAC, de ciclo celular rápido^{29,37}; (3) as células da protuberância são relativamente indiferenciadas^{21,38}; (4) a aplicação tópica de um agente iniciador tumoral na pele de murinos, durante o início da fase anágena (quando as células da protuberância folicular estão se dividindo), produz um número maior de tumores do que a mesma aplicação durante a fase telógena (quando as células da protuberância folicular estão quiescentes). Partindo-se do princípio de que as células-tronco estão envolvidas na formação de tumores, este fato não pode ser considerado como uma mera coincidência e indica que as células-tronco foliculares podem originar cânceres cutâneos, induzidos experimentalmente³⁹.

O reconhecimento da localização exata das células-tronco no epitélio folicular levantou a possibilidade de que interações específicas entre as células-tronco da protuberância e as células mesenquimais da papila folicular durante o início da fase anágena pudessem levar à “ativação” das células quiescentes da protuberância – Teoria da Ativação das Células da Protuberância.⁴⁰ (**Figura 1**) Segundo essa teoria, o FPS reinicia sua fase anágena quando “sinais” da papila folicular ativam, de forma transitória, as células quiescentes da protuberância de folículos telógenos, resultando na geração das TAC. As TAC formam um novo germe secundário que, em conjunto com a papila, formam o novo bulbo folicular. Conforme a papila é empurrada para baixo pela projeção epitelial, as células-tronco da protuberância retornam ao seu estado normal de quiescência. Após um período de intensa proliferação, as TAC, de ciclo celular rápido, esgotam seu potencial proliferativo e sofrem uma diferenciação terminal. Isso resulta na degeneração (catágena) dos dois terços inferiores do folículo pilo-sebáceo (FPS). Durante a fase catágena a papila folicular migra para cima e posiciona-se na base do folículo telógeno. Essa localização ao lado da protuberância é essencial para o re-início de outro ciclo. De todas as teorias até então propostas para explicar a cinética do ciclo folicular, esta é considerada a mais abrangente e amplamente aceita até o momento.

Figura 1 – Teoria da ativação das células da protuberância. Adaptado de Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM. Hair follicular stem cells: The bulge activation hypothesis. *J Invest Dermatol.* 1991; 98:77s–78s. As células-tronco são ativadas/estimuladas ao final da fase telógena, pelo contato com as células da papila folicular. Em seguida, apresentam um período transitório de proliferação durante o início da fase anágena. A partir dessa proliferação celular forma-se o germe secundário, que são as células existentes na matriz, as quais sofrem uma amplificação transitória, levando à formação de um novo bulbo e que são capazes de se diferenciar em medula, córtex e cutícula pilar. Durante a fase anágena IV, as células da papila folicular proliferam e apresentam uma “descondensação” transitória. O contato entre a papila e área saliente é de fundamental importância para que haja o início de um novo ciclo.

A protuberância folicular, considerada anteriormente um mero acidente anatômico, onde se dá a inserção do músculo eretor do pêlo, foi originalmente descrita por Unna (1876)*1 e por Sthor (1904)*2 apud Cotsarelis (1990),²¹ com o nome de “Der Wulst” e, posteriormente, chamada de “bulge”, por autores de origem anglo-saxônica.^{41,42} Essa área protrusa está situada abaixo da abertura do ducto da glândula sebácea, e delimita o final da porção permanente do folículo piloso. Durante o período embrionário (16-18 semanas), apresenta-se como uma estrutura proeminente, hemisférica, composta por queratinócitos indiferenciados, podendo ultrapassar até mesmo o tamanho do bulbo.⁴³ Representa o brotamento mais inferior, encontrado na face posterior, do germe epitelial primário. Em folículos terminais de adultos, apresenta-se como uma zona levemente saliente da bainha radicular externa, na qual podem ser evidenciadas células epiteliais com núcleos grandes e claros.¹⁹ A protuberância folicular pode apresentar variações morfológicas normais, como projeções epiteliais em forma de vilosidades ou brotamentos, de tamanho e formato variáveis.⁴¹ Em determinadas condições, como na psoríase e durante a regeneração epidérmica, também podem ocorrer alterações de sua morfologia.⁴⁴

As células epiteliais da BRE ao nível da protuberância folicular expressam citoqueratinas, moléculas de adesão celular, citocinas e receptores de fatores de crescimento, que são distintos daqueles encontrados em outras células epidérmicas.⁴⁵⁻⁴⁷ Através da demonstração do baixo nível da enzima telomerase, Ramirez et al,⁴⁸ em 2000, comprovaram o baixo índice de atividade mitótica existente

*1- Unna PG. Arch Mikroskop Anat Entwicklungsmech. 1846; 12:665-741.*2- Sthor P. Anat Hefte Abt. 1903; 23:1-66.

nessa região. Ultra-estruturalmente, as células encontradas nessa região possuem achados característicos de células indiferenciadas como ribossomas abundantes, partículas de glicogênio e organelas citoplasmáticas esparsas.³⁸

Taylor et al²⁹, em 2000, demonstraram, em murinos, que as células derivadas das células-tronco da protuberância podem dar origem a vários compartimentos do FPS, incluindo a parte inferior da BRE, matriz e medula. Esses achados deixam claro que as células da protuberância dão origem às células multipotentes indiferenciadas da matriz, que são capazes de gerar a haste pilosa. Oshima et al⁴⁹, em 2001, demonstraram que a região da protuberância da vibrissa de murinos, que expressa [beta]-galactosidase quando transplantada para vibrissa de ratos normais, pode dar origem a todas as células do epitélio folicular, assim como produzir a haste pilosa. Recentemente, foi demonstrado que as células da protuberância expressam o gene da nestina e que podem dar origem ou fornecer as células endoteliais que constituem os vasos sanguíneos da pele.⁵⁰

Lavker et al⁵¹ demonstraram o caráter multipotente das células-tronco foliculares e propuseram a existência de uma unidade epidermo-pilo-sebácea, na qual as células derivadas das células-tronco da protuberância folicular dão origem não só à haste pilosa, mas também à epiderme e à glândula sebácea. **(Figura 2)** Taylor et al.²⁹ demonstraram que as células originadas na protuberância folicular migram para a epiderme e continuam a proliferar, contribuindo para a homeostase da epiderme. Morris et al.⁵² e Blanpain et al.⁵³, em 2004, demonstraram que células isoladas da

protuberância folicular, são capazes de reconstituir todo o epitélio cutâneo. Com base nessas informações, pode-se concluir que a protuberância folicular é o maior reservatório de queratinócitos da pele e que, portanto, deve ser considerada como a principal fonte de células-tronco epidérmica⁵⁴.

Em 2002, Ito et al.⁵⁵ demonstraram que as células da protuberância entram em apoptose após a depilação mecânica da haste pilosa. Essas células são substituídas por células do germe secundário em um processo que os autores denominaram de “desdiferenciação”. A protuberância sofre uma diminuição e um remodelamento durante a fase catágena devido à apoptose.⁵⁶

Figura 2 – Representação esquemática da unidade epidermo-pilo-sebácea. Adaptado de: Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, Yang JS, Sun TT. Hair follicle stem cells. Their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol.* 1993; 101:16S–26S. As células da protuberância através da via 1 dão origem às células amplificadoras transitórias da matriz, capazes de formar a haste pilosa. Através da via 2, as células da protuberância dão origem às células progenitoras da epiderme.

3.3 Protuberância folicular nas alopecias

Independentemente da forma de agressão (inflamatória, traumática, tumoral ou degenerativa), o esgotamento do potencial proliferativo das células-tronco pode levar a uma perda irreversível da capacidade regenerativa tecidual, cuja representação clínica, em se tratando do folículo piloso, seria a alopecia. Segundo a “teoria da ativação das células da protuberância”, quatro elementos são fundamentais para o controle do ciclo folicular: ativação da protuberância, ativação da papila dérmica, potencial proliferativo limitado das células matriciais e a migração para cima da papila folicular. Uma alteração em qualquer um desses elementos pode resultar em uma alteração do crescimento ou perda do pêlo.

3.3.1 Alopecia da doença enxerto *versus* hospedeiro (DEVH) – foliculite citotóxica

Apesar da patogênese da doença enxerto *versus* hospedeiro ainda não estar totalmente esclarecida, sabe-se que as células-alvo da resposta imune celular na pele são as células-tronco epidérmicas encontradas nas cristas interpapilares. Murphy et al.²³ demonstraram que, assim como as células-tronco da epiderme interfolicular, as células-tronco da protuberância de folículos anágenos também são seletivamente atingidas durante a fase aguda da doença, levando a um quadro conhecido como foliculite citotóxica. Os infiltrados de células T encontrados na região da protuberância precedem a infiltração da epiderme interfolicular e estão associados à transição do folículo acometido para a fase telógena. Esta observação levou os autores a

especularem sobre o valor do achado histopatológico da foliculite citotóxica como indicador precoce da DEVH, mesmo antes de haver um dano significativo da epiderme. Sale et al.²² compararam o comprometimento da região da protuberância com a lesão dos bulbos foliculares de 22 pacientes com DEVH. Em 19 casos houve um dano preferencial da protuberância, dois acometeram as duas regiões e em um nenhuma das regiões foi atingida.

3.3.2 Líquen plano pilar

O líquen plano pilar é caracterizado clinicamente pela presença de pápulas foliculares ceratósicas que, frequentemente, evoluem com a formação de áreas de alopecia cicatricial. Essa, em seu estágio final, não pode ser diferenciada da alopecia decorrente de outras doenças inflamatórias que levam à destruição do FPS e à fibrose.

Mehregan et al.⁵⁷, após realizarem um estudo clínico-patológico de 45 casos de líquen plano pilar, observaram que a região mais atingida do epitélio folicular parece ser o infundíbulo, sendo que o istmo é acometido em 1/3 dos casos. Em todos os casos o infiltrado inflamatório poupou a região do bulbo folicular. Tais achados justificariam o porquê do caráter cicatricial desta forma de alopecia, uma vez que o compartimento onde estão situadas as células-tronco é frequentemente envolvido.

3.3.3 Alopecia no lupus eritematoso discóide

Assim como o líquen plano pilar, o lupus eritematoso discóide pode levar a um quadro de alopecia cicatricial, decorrente da destruição irreversível do epitélio folicular. O acometimento, predominantemente, do istmo pelo infiltrado inflamatório e não da papila folicular, parece indicar a importância da integridade das células-tronco da protuberância folicular na gênese desta forma de alopecia.⁵⁸

3.3.4 Alopecia areata

A alopecia areata é caracterizada, fundamentalmente, pela presença de um infiltrado inflamatório mononuclear peribulbar, pelo aumento da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e dos antígenos HLA-DR na porção folicular inferior. A região da protuberância folicular é poupada.⁵⁹ Embora seja considerada uma forma de alopecia inflamatória, não possui um caráter cicatricial, sendo observada a repilação da área comprometida.

3.3.5 Alopecia androgenética

A alopecia androgenética (AAG) caracteriza-se por ser um processo espontâneo, progressivo e irreversível, no qual as células da matriz folicular perdem o seu potencial de produzir um novo ciclo anagênico ao longo dos anos, levando a uma miniaturização dos folículos do couro cabeludo. Jaworsky et al.⁶⁰, a partir de um estudo histológico, imunohistoquímico e ultra-estrutural de 4 pacientes com AAG, demonstraram que em áreas

transicionais (alopécicas x não alopécicas) havia infiltração de células T ativadas ao redor da protuberância, levando à indução de antígenos de classe II na adventícia de vênulas do tecido conjuntivo e hiperplasia de células dendríticas CD1a positivas. Embora essa reação mediada por células possa ser encarada como secundária à ação androgenética no metabolismo folicular, foi sugerido que a fibrose progressiva da bainha perifolicular, que ocorre na alopecia androgenética, possa ser decorrente da ação de linfócitos T ativados no reservatório de células-tronco. “Apesar de não ter sido evidenciada uma citotoxicidade direta na população de células-tronco, é possível que mediadores solúveis resultantes do processo de inflamação criem um ambiente local deletério às estimulações cíclicas das células-tronco”. Assim como o acometimento da protuberância, o espessamento da bainha de tecido conjuntivo pode levar a uma interrupção do ciclo folicular, resultando na queda do cabelo.

Em nossa dissertação de Mestrado, após compararmos a densidade de estruturas foliculares com a densidade de folículos que apresentavam células CK19+ da protuberância folicular (células-tronco) das regiões acometida e não acometida do couro cabeludo de pacientes com alopecia androgenética, concluímos que quanto menor é a relação folículos terminais/velos mais difícil é a identificação da área de inserção do músculo eretor do pêlo/protuberância e, menor é o número de folículos que apresentam células CK19 positivas.⁶¹

Cowper et al.⁶², em 2002, relataram um aumento da expressão de Bcl-2 nas regiões acometidas pela AAG. Foi sugerido que um aumento da

susceptibilidade aos mediadores da expressão do Bcl-2, ou que uma resposta alterada dos receptores de Bcl-2, nessas regiões, possam estar envolvidos na gênese da AAG. Os autores descreveram ainda que os sítios TUNEL positivos encontrados na região do istmo/protuberância em couro cabeludo de murinos, também ocorrem em humanos.

3.3.6 Folliculite de células-tronco

Kossard ⁶³, em 1999, relatou o caso de uma paciente de 34 anos, com história de queda de cabelos difusa não-cicatricial, com evolução de 8 anos. No exame histopatológico do couro cabeludo foram observadas miniaturização folicular e a presença de infiltrado inflamatório, predominantemente linfocítico, em cunha, concentrado ao redor da protuberância folicular. A ausência de qualquer outro dado clínico significativo e a evolução difusa, arrastada do quadro levou o autor a cogitar a hipótese da existência de um quadro de folliculite de células-tronco como entidade isolada, e não como parte de processos mais complexos como a DEVH e a alopecia areata.

3.4 Apoptose

É uma forma de morte celular, muito bem regulada, que obedece padrões morfológicos e bioquímicos característicos. Distingue-se da necrose por dois aspectos básicos: primeiro, porque é um processo ativo durante o qual os constituintes celulares se reorganizam e se agrupam,

sendo a célula fragmentada em componentes envoltos por uma membrana (corpos apoptóticos), os quais não sofrem autólise, mas são fagocitados por células residentes no tecido enquanto ainda estão viáveis; o outro aspecto é que a apoptose acomete células individualmente ou pequenos grupos celulares.

Por acometer células de forma isolada e por não induzir exsudação de fagócitos, a apoptose não é facilmente visível à microscopia óptica. Sua principal característica é uma acentuada retração da célula, que chega a perder um terço de seu volume, em alguns minutos.⁶⁴ O mecanismo responsável por essa contração celular ainda não é totalmente conhecido, mas está relacionado com a troca de íons e de água através da membrana plasmática. Os característicos fragmentos ou corpos apoptóticos basofílicos, podem ser vistos no interstício ou no interior de outras células. São estruturas diminutas e possuem vida curta, sendo removidos do tecido em um período de horas. Desta forma, a quantificação de um índice apoptótico através de um exame morfológico isolado pode ser difícil. À microscopia eletrônica, as células em apoptose são facilmente identificáveis. O núcleo mostra cromatina agrupada, formando massas junto à membrana nuclear; o contorno nuclear fica progressivamente irregular (aspecto cerebriforme), os poros da membrana nuclear desaparecem e esta termina por se romper, ficando os fragmentos nucleares dispersos no citoplasma. Este se desidrata e condensa; as organelas agrupam-se, mas mantêm seu padrão morfológico característico; as microvilosidades desaparecem, os aparelhos juncionais se desfazem e surgem depressões ou fendas na membrana que

progressivamente separa a célula em glóbulos delimitados por membrana. Esses podem ser observados no interstício ou no interior de células vizinhas. Uma vez incorporados por endocitose, os corpos apoptóticos são digeridos pela ação das enzimas lisossômicas.⁶⁵

A apoptose é encontrada nos processos chamados de morte fisiológica, como os que ocorrem durante a morfogênese de órgãos, tanto na vida embrionária quanto após o nascimento. Atua como um mecanismo regulador do número de células e de defesa contra células danificadas, infectadas por vírus ou transformadas. Pode ser observada durante a involução da glândula mamária após a lactação ou no útero durante o ciclo menstrual. A involução de órgãos hiperplasiados, após a cessação do estímulo que produziu a hiperplasia, também depende da apoptose. Como processo patológico, a apoptose é observada em lesões induzidas por agressão imunitária celular (células T citotóxicas e *natural killer*), radiações ionizantes, infecções virais (p.ex. hepatite viral e pelo HIV-1) ou por drogas citostáticas. Particularmente marcante é a ocorrência da apoptose durante a rejeição a enxertos.⁶⁶

3.4.1 Controle da apoptose

Independentemente do tipo celular ou sítio anatômico, a morfologia da apoptose tende a ser estereotipada. Vias diferentes levam à ativação de um mesmo mecanismo final.⁶⁷ Quatro receptores celulares estão envolvidos: Fas (CD95)⁶⁸, p55 TNF⁶⁹, receptores TRAIL/APO2-L (TNF “related apoptosis-

inducing ligand”) 1 e 2⁷⁰. Eles se ligam respectivamente ao Fas-ligante (Fas-L), TNF e TRAIL/APO 2-L. A ativação desses receptores mortais recruta proteínas adaptadoras FADD (“Fas-associated death domain”),⁷¹⁻⁷³ TRADD (TNF “receptor-associated death domain”) ou ambas^{74,75}, que sequencialmente ativam a família das enzimas caspases. Atualmente, 14 caspases são conhecidas. As caspases 3 (CPP32) e 8 (FLICE) estão relacionadas com a apoptose mediada pelos receptores Fas, p55TNF e TRAIL/APO.⁷⁶⁻⁸¹ As caspases ativadas catalisam a clivagem de outras caspases, que por sua vez ativam várias proteases e endonucleases celulares que clivam proteínas celulares estruturais e reguladoras, assim como o DNA nuclear, levando as alterações morfológicas e bioquímicas vistas na apoptose. O complexo de proteínas Fas, FADD e pró-caspase 8, que desencadeia a apoptose também é conhecido pela sigla DISC (“death inducing signaling complex”).⁶⁴

A apoptose induzida pela via Fas está relacionada primordialmente com as seguintes situações: morte celular induzida por linfócitos T citotóxicos (p.ex. células infectadas com vírus), destruição de linfócitos T ativados ao final da resposta imune e destruição de células inflamatórias em sítios imunologicamente privilegiados.⁶⁷

Diversos estímulos, que não os mediados pelos receptores, como proteínas virais, quimioterápicos, radiação ultravioleta e ionizante, produzem alterações mitocondriais que provocam a liberação de proteínas reguladoras da apoptose (citocromo-c, fator ativador da protease apoptótica - Apaf-1 e caspase 9), levando a ativação das caspases (pró-caspase 9) e a morte

celular.⁸²⁻⁸⁵ Embora a apoptose clássica induzida pela via Fas leve a ativação das caspases sem envolver a via mitocondrial (Tipo 1), certos tipos de apoptose Fas-induzidas podem requerer a ativação mitocondrial (Tipo 2).⁸⁶

Outras proteínas que estão envolvidas na inibição da apoptose são: a c-FLIP (“cellular FLICE-like inhibitory protein”), que se liga ao FADD e previne a ativação da caspase 8; a família das proteínas inibidoras de apoptose (IAP), incluindo a HIAP, XIAP e outras, que atuam através da inibição da caspase 3; o Bcl-2 e proteínas afins, como Bax, Bcl XS, Bcl XL e Bad, que regulam sinais intracelulares que ativam ou inibem a apoptose.⁸⁷⁻⁸⁸

Como consequência da ativação da cascata das caspases temos as alterações nucleares encontradas na apoptose como a clivagem do DNA celular em unidades nucleossomais. Esse processo de fragmentação do DNA é devido às seguintes alterações: 1) inativação de enzimas envolvidas no reparo do DNA, como a poli (ADP-ribose) polimerase ou PARP; 2) inativação de enzimas envolvidas na replicação celular, como a DNA topoisomerase III; 3) quebra de proteínas nucleares estruturais, como as lamininas (caspase 6); 4) fragmentação do DNA devido a ação da enzima DNase ativada por caspase ou CAD.⁸⁹

3.4.2 Alterações das moléculas controladoras da apoptose na infecção pelo HIV

Células obtidas de pacientes infectados pelo HIV e células infectadas *in vitro* pelo HIV apresentam alterações moleculares nos receptores que induzem a apoptose. As principais são:⁸⁶

- A- Aumento da expressão na membrana de Fas e Fas-L através da diminuição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl XL e aumento das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bcl XS. Também há uma diminuição dos níveis intracelulares de c-FLIP.
- B- Aumento dos níveis séricos de TNF- α em pacientes sintomáticos. A infecção de linfócitos e monócitos pelo HIV leva a um aumento da produção de TNF- α . O TNF- α ativa a transcrição do fator NF κ B, que ativa a transcrição do HIV. Inicia-se um ciclo autócrino que resulta em altos níveis de TNF- α e de transcrição de HIV.
- C- Disfunção dos receptores TRAIL/APO2-L e do TRAIL/APO2-L.

3.4.3 Apoptose e auto-imunidade

A resposta imune a um agente externo envolve a proliferação de linfócitos T e B. Após desempenharem seu papel, essas células devem ser removidas da corrente sanguínea, restando apenas uma pequena população de células de memória. Essa remoção é feita por apoptose. O não reconhecimento dessas células, ou qualquer alteração na indução da apoptose, podem levar a geração inapropriada de células T auto-reativas ou auto-anticorpos.

Um modelo de alteração no mecanismo da apoptose de linfócitos é, a recentemente descrita, síndrome linfoproliferativa auto-imune.⁹⁰ O defeito principal está relacionado com uma mutação nos receptores Fas e TNF, resultando no acúmulo crônico de células linfóides não malignas nos gânglios linfáticos e baço e no surgimento de clones auto-reativos, responsáveis pelo desencadeamento de fenômenos de auto-imunidade.

3.4.4 Auto-imunidade e infecção pelo HIV

Pacientes infectados pelo HIV apresentam uma diminuição do número de linfócitos CD4+ circulantes, resultando em imunodepressão e susceptibilidade aumentada a infecções oportunistas e tumores. Embora a produção de células CD4+ esteja comprometida, existem atualmente evidências de que o motivo primordial para depleção de células CD4+ seja a apoptose⁸⁶. Apenas uma pequena fração desses linfócitos está de fato infectada, indicando que o mecanismo que desencadeia a apoptose é outro, e não a infecção viral das células em si. Proteínas virais (gp120, Nef, Tat, Vpu, Vpr e protease) ligam-se ao CD4 de células não infectadas ocasionando sua morte devido a uma reação cruzada. Os mecanismos envolvidos estão relacionados com a ativação dos receptores de morte celular: aumento da expressão do Fas (CD95), Fas-L (CD95L) e do TNFR-TNF/TRAIL ; ou através da via mitocondrial: fosforilação da proteína p53, aumento da expressão do Bax, dissipação do potencial transmembrana, liberação do citocromo c e ativação das caspases.⁹¹⁻⁹⁴

Outro exemplo de auto-imunidade encontrada na infecção pelo HIV é a presença de altos níveis de auto-anticorpos circulantes⁹⁵, incluindo anticorpos anti-nucleares, anti-fosfolipídeos, anti-músculo liso, anti-plaquetários, anti-eritrócitos e fator reumatóide.⁹⁶⁻¹⁰⁰ Manifestações clínicas como vasculites sistêmicas,¹⁰¹ síndrome de Reiter¹⁰², poliartrite¹⁰³ e síndrome de Sjögren¹⁰⁴ também foram descritas no contexto da infecção pelo HIV e outros vírus (p.ex. Epstein-Barr, citomegalovírus, hepatite A, B e C).⁹⁵

3.5 Cinética tecidual da epiderme e do folículo pilo-sebáceo. Equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada

A morte celular programada é o destino final dos queratinócitos epidérmicos, do bulbo e da BRE folicular. Conforme vai ocorrendo a diferenciação dos queratinócitos, há produção de filamentos protéicos intermediários (queratina), enzimas (p.ex. transglutaminase) e proteínas estruturais (p.ex. involucrina), que formam um envelope córneo rígido. A desintegração nuclear dessas células ocorre por apoptose.¹⁰⁵

O folículo pilo-sebáceo (FPS) é um micro-órgão anexo do tecido cutâneo caracterizado por sua natureza cíclica. Durante o seu desenvolvimento e ciclo, o FPS atravessa repetidamente três padrões de desenvolvimento. Inicialmente, durante sua morfogênese, dois grupamentos celulares, um de células epiteliais e outro de células mesenquimais, se entrelaçam e formam uma estrutura complexa responsável pela produção da haste pilosa. Em segundo, durante a fase de involução (catágena) esse

complexo mini-orgão atravessa um processo muito bem controlado de regressão, que leva a uma redução de seu comprimento, seguida de reconstrução de um folículo menor que entra na fase de repouso (telógena). Em terceiro, o FPS reinicia sua atividade, tornando novamente a fabricar a haste pilosa (anágena).¹⁰⁶ Durante esses três processos evolutivos distintos, um princípio básico tem que ser respeitado: o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada - apoptose. O balanço desse equilíbrio é a chave para o controle do crescimento e regressão do FPS e é o fator determinante para o tratamento de distúrbios do ciclo folicular.¹⁰⁴

A regressão, associada à fase catágena, é um processo único, caracterizado pela apoptose maciça dos queratinócitos do bulbo piloso. Mesmo durante os estágios iniciais da morfogênese do FPS, em murinos, uma quantidade considerável de células apoptóticas pode ser detectada através da microscopia eletrônica. A indução da apoptose vista durante o período catágeno está relacionada com múltiplos fatores: Fas, TGF- β , TNF- α , FGF-5, IGF-1, PTHrp, neurotrofinas e outros. Muller-Rover et al.¹⁰⁴, através de marcadores imunohistoquímicos relacionados com apoptose (TUNEL, Bcl-2, Bax, enzima conversora da interleuquina 1- β , Fas/Apo-1, p55 TNFR e p75 NTR), identificaram os principais sítios de apoptose no FPS durante o ciclo folicular em murinos. Curiosamente, durante a fase anágena (VI), células epiteliais TUNEL-positivas (apoptóticas) foram vistas na parte distal da BRE, incluindo o istmo e a protuberância folicular, onde estão situadas as células-tronco. Os queratinócitos nessa região mostraram-se Bcl-2 (anti-apoptótico) positivos e Bax (pró-apoptótico) negativos. Em sua

discussão, os autores sugerem que a expressão de Bcl-2 talvez esteja envolvida com a proteção da população de células-tronco contra a diferenciação pós-mitótica, senescência e morte. Frente à quantidade significativa de apoptose encontrada na BRE, nas porções distais ao MEP, os autores questionaram o caráter permanente desta porção do FPS e sugeriram que a indução da apoptose envolve o remodelamento de todo o FPS de murinos e, não somente, as porções proximais. A apoptose de células-tronco, em condições fisiológicas, é descrita em outros tecidos com poder de auto-renovação. A provável causa seria o controle do número de células ou a remoção de células danificadas, diminuindo, dessa forma, a probabilidade de uma transformação carcinogênica.¹⁰⁷ A apoptose vista na protuberância folicular durante a fase catágena pode estar simplesmente relacionada com as alterações arquiteturais associadas com a regressão folicular.⁵

A alopecia relacionada com a infecção pelo HIV-1 é difusa e de tipo não cicatricial. Caracteriza-se por alteração da textura e diminuição progressiva da densidade dos cabelos. Os mecanismos patogénéticos desse processo ainda não foram elucidados. Há um único trabalho na literatura médica⁶ que descreve a apoptose de células tronco-foliculares da protuberância folicular, como um achado característico dessa alopecia e propõe, para essa alopecia, um mecanismo semelhante ao observado na DEVH. Entretanto, esses autores não realizaram estudo comparativo com grupo controle de indivíduos hígidos não alopécicos.

A apoptose é evento que ocorre no processo do ciclo evolutivo e remodelamento do FPS, particularmente na fase catágena. Na AIDS é descrita a alteração de moléculas controladoras de apoptose, o que resulta na facilitação desse processo.

Pareceu-nos interessante realizar estudo para caracterizar as alterações histopatológicas e morfométricas da alopecia difusa não cicatricial de grupo de doentes HIV-1 positivos. Assim como, demonstrar e comparar a frequência de apoptose de células tronco-foliculares e amplificadoras transitórias da protuberância folicular desses casos, comparando-os com grupo controle de indivíduos não alopécicos.

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

No período de janeiro de 2003 a janeiro de 2005, foram selecionados pacientes HIV-1 positivos que, quando questionados, apresentavam como queixa, uma diminuição do volume e/ou alteração da textura capilar e apresentavam ao exame clínico alopecia difusa não cicatricial. Quinze pacientes concordaram em participar do estudo. Sete pacientes eram do sexo masculino e oito do sexo feminino, com idade variando entre 22 e 42 anos (média=35,3; DP=6,5), com níveis de CD4 variando entre 66 e 601 células/mm³ (média=302,7; DP=134,5). Foram excluídos do estudo pacientes que relatassem uma queda efetiva dos cabelos, ou apresentassem qualquer outro tipo de alopecia (cicatricial, androgenética) e eflúvio telógeno agudo. Adotamos como critério para o diagnóstico de eflúvio telógeno agudo o teste de tração leve positivo, ou seja, o desprendimento de mais de 10 fios capilares quando realizamos uma tração leve em todo o couro cabeludo. **(Tabela 1) (Figuras 3 e 4)**

Como controle foram selecionados 12 indivíduos voluntários, hígidos, cinco do sexo masculino e sete do sexo feminino, com idade variando entre 25 e 64 anos (média= 34,0; DP=11,0), que não apresentassem nenhum tipo de queixa capilar ou forma de alopecia e não estivessem em uso de qualquer medicação. **(Tabela 2)**

Tabela 1 - Caracterização dos pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, quanto ao sexo, idade, nível de células CD4+ no sangue, data da confirmação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e drogas em uso na ocasião do estudo.

CASO	SEXO	IDADE (anos)	CD4 (cél/s/mm ³)	DIAG. HIV	DROGAS
1	M	35	356	1995	laminovudina*, estavudina**, efavirenz*
2	M	41	401	1998	laminovudina*, zidovudina*, efavirenz*, sulfametoxazol+trimetropin, metronidazol, ciprofloxacina, haloperidol, captopril
3	M	37	200	2003	rifampicina, sulfametoxazol+trimetropin, insulina NPH
4	M	42	273	1999	sulfadiazina, pirimetamina, ácido fólico
5	M	40	300	2000	nelfinavir***, DDI
6	M	44	66	2000	laminovudina*, zidovudina*, indinavir***
7	M	41	215	1982	laminovudina*, zidovudina*, efavirenz*
8	F	35	398	1999	-
9	F	42	150	1998	nelfinavir*** e DDI
10	F	28	601	2002	laminovudina*, zidovudina*, efavirenz*, sulfadiazina, ácido fólico, pirimetamina, estavudina**
11	F	34	333	NR	-
12	F	31	200	1994	-
13	F	31	301	1998	ampicilina, laminovudina*, zidovudina*, efavirenz*
14	F	22	267	2000	efavirenz*, laminovudina*
15	F	27	480	1999	AZT*, laminovudina*, efavirenz*, sulfametoxazol+trimetropin, azitromicina

M - sexo masculino; F - sexo feminino; CD4 (cél/s/mm³) - número de linfócitos CD4+/mm³; NR - não relatado; DIAG. HIV - ano do diagnóstico da infecção pelo HIV-1; *inibidor da transcriptase reversa; **análogo da timidina; ***inibidor de protease; DDI - nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa

Figura 3- Alopecia difusa não cicatricial de paciente HIV-1 positivo. Aspecto clínico da observação 9. Rarefação capilar difusa na região frontal.

Figura 4- Alopecia difusa não cicatricial de paciente HIV-1 positivo. Aspecto clínico da observação 9. Paciente queixava-se de alteração do volume e da textura capilar; região temporal esquerda.

Tabela 2- Grupo controle – dados de sexo e idade dos indivíduos hígidos não alopecicos.

CONTROLE	SEXO	IDADE (anos)
1	M	43
2	F	25
3	F	32
4	F	26
5	F	30
6	F	25
7	F	34
8	M	28
9	M	28
10	F	64
11	M	39
12	M	34

M - sexo masculino; F - sexo feminino

Após terem sido devidamente informados a respeito da pesquisa, na qual estariam envolvidos e expresso, por escrito, seu desejo de participar (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – **Anexo 1**), os pacientes foram submetidos à biópsia de couro cabeludo da região occipital com “punch” de 4 mm, sob anestesia local com lidocaína a 2%. Após ser fixada em solução tamponada de formol a 10%, por um período mínimo de 24 horas, a amostra tecidual foi clivada no sentido transversal a 0,8 cm da junção da derme com a gordura, segundo a técnica de Headington modificada.⁶¹ (**Figura 5**) Obtivemos, dessa forma, dois fragmentos de formato cilíndrico, que foram marcados com tinta Nanquim, nas suas superfícies de corte (superfície inferior do fragmento superior e a superfície superior do fragmento inferior) e processados para inclusão em um único

bloco de parafina, com as superfícies marcadas voltadas para baixo. O material emblocado em parafina foi submetido à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 μ m de espessura (dois cortes em cada lâmina) colhidos em lâminas de vidro tratadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648). Uma das lâminas foi corada pela técnica tricrômica de Gomori e os demais destinados às técnicas imunohistoquímicas.

Figura 5- Representação esquemática da clivagem do material. Adaptado de: *Atlas of differential diagnosis of hair loss*. Whiting D e Howsden FL. Canfield Publishing. New Jersey, USA, 1998.
JDG – junção entre derme e tecido gorduroso da hipoderme.

4.2 Análise histopatológica

Realizou-se análise morfométrica na qual foram levadas em consideração as seguintes estruturas, encontradas em cada corte histológico:

- Número de unidades foliculares
- Número total de folículos
- Número de folículos terminais
- Número de folículos velos
- Número de folículos anágenos
- Número de folículos catágenos
- Número de folículos telógenos
- Número de tratos fibrosos residuais
- Número de unidades telógenas germinativas

Para padronizar a coleta de dados, consideramos o maior número de estruturas representado em um dos dois cortes histológicos presentes em cada lâmina.

A contagem do número de unidades foliculares foi feita levando-se em conta a quantidade de unidades foliculares anatomicamente completas encontradas na área circunferencial da amostra. Em seguida, foi traçada uma linha divisória no local de maior diâmetro da amostra, e as unidades foliculares parcialmente representadas nas margens de um dos lados foram somadas.

A classificação dos folículos pilosos em terminais ou velos foi baseada na comparação entre a espessura da bainha radicular interna (BRI) folicular e o diâmetro da haste pilosa, da seguinte maneira:

- Diâmetro da haste pilosa maior que a espessura da BRI - Pêlo terminal
- Diâmetro haste pilosa menor que a espessura da BRI - Pêlo velo

Para fins de classificação, não levamos em consideração a ocorrência de pêlos intermediários. Tanto as unidades telógenas germinativas (TGU), quanto os tratos fibrosos residuais (TFR) não foram contabilizados no número total de folículos, mas como estruturas foliculares individuais.

O infiltrado inflamatório foi considerado presente ou ausente, de acordo com o achado de células inflamatórias na região perifolicular.

4.3. Demonstração de apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular

Com a finalidade de pesquisarmos a ocorrência do fenômeno da apoptose nas células indiferenciadas pluripotenciais (células-tronco e células amplificadoras transitórias) presentes na região da protuberância folicular foi realizada a técnica da dupla marcação simultânea com o anticorpo anti-citoqueratina 19 (CK19), marcador de células-tronco e pelo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase d-UTP fluorescein Nick-End Labeling), marcador de apoptose.

Como segundo marcador de apoptose foi utilizado, de forma isolada (não em dupla marcação), o anticorpo anti-caspase 3 clivada.

Anticorpo monoclonal anti-citoqueratina 19 (CK19)

Devido à falta da porção terminal não- α -helicoidal em sua estrutura, a citoqueratina 19 é uma proteína que não possui a capacidade de formar filamentos e sua expressão é considerada como um indicador de indiferenciação celular. Narisawa et al.¹⁰⁸, baseados em três fatos — que as células-tronco são consideradas células relativamente indiferenciadas tanto ultra-estruturalmente quanto bioquimicamente, que sua heterogenia morfológica é interpretada como um achado indicativo de células germinativas, e que até então não se conseguira isolar um marcador imunohistoquímico específico para células-tronco — propuseram o uso de anticorpos monoclonais específicos para citoqueratina 19, como uma alternativa para demonstração direta dessa subpopulação de células. Michel et al.,¹⁰⁹ demonstraram, através de estudos imunohistoquímicos, que a citoqueratina 19 atuaria como um marcador bioquímico das células germinativas pluripotenciais cutâneas *in vivo* e *in vitro*. Esses achados corroboraram os de Stasiak et al.,¹¹⁰ que demonstraram que os queratinócitos basais da saliência folicular expressavam o gene da citoqueratina 19.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase d-UTP fluorescein Nick-End Labeling)

É sistema misto de biologia molecular e imunohistoquímica capaz de identificar as quebras das fitas de DNA simples e de dupla hélice associadas com apoptose, através da marcação enzimática do terminal livre 3'OH com nucleotídeos modificados. As novas terminações de DNA, que são geradas com a fragmentação da cromatina durante a apoptose, situam-se caracteristicamente no núcleo e nos corpos apoptóticos. Caso o dano ao DNA seja induzido por drogas não há marcação, exceto se houver indução do mecanismo da apoptose. Os nucleotídeos modificados são enzimaticamente ligados ao DNA fragmentado através da ação catalizadora da transferase deoxinucleotidil terminal (TdT). Os nucleosídeos incorporados formam oligômeros compostos por nucleotídeos conjugados à digoxigenina e nucleotídeos não marcados em uma sequência randômica. Os fragmentos de DNA marcados com nucleotídeos-digoxigenina ligam-se então a anticorpos anti-digoxigenina conjugados à peroxidase. De acordo com McCloskey et al.¹¹¹, o TUNEL é o método mais específico para detecção de apoptose em células do sangue periférico em pacientes HIV-positivos.

Protocolo utilizado para realização da dupla marcação - TUNEL e CK19:

1- Cortes histológicos de quatro micrômetros (colhidos em lâminas tratadas com a solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane [Sigma Chemical Co, St. Louis, MO/USA, cód A3648]) e selecionadas ao microscópio de luz, como representativas de perfis de folículos pilosos ao nível da protuberância, foram submetidos a desparafinização em xilol e

hidratação em cadeia descendente de etanol, seguida de lavagem com água destilada e solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2 por cinco minutos.

2- O material foi submetido a pré-tratamento com proteinase K (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO/USA, P6556) (20µg/ml) diluída em PBS por 15 minutos, à temperatura ambiente para melhor exposição dos sítios antigênicos; seguido de duas lavagens em água destilada de dois minutos cada.

3- Fez-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 2% em PBS por 10 minutos; seguido de lavagem em água corrente, três lavagens de três minutos em água destilada; uma lavagem em PBS, por cinco minutos.

4- Submeteu-se o material a bloqueio com leite desnatado Molico (Nestlé) 6% em PBS pH 7,4, por 30 minutos a 37°C; seguido de três lavagens de três minutos com PBS.

5- Fez-se, a seguir, a incubação do material sobre as lâminas com “equilibration buffer”, por 10 segundos à temperatura ambiente;

6- A seguir, os cortes histológicos foram secos e aplicou-se o “working strength TdT Enzyme” (diluição do “TdT Enzyme” 1:12, ou seja, 1µg de TdT e 11µg de “Reaction Buffer”), com incubação em câmara úmida a 37°C por uma hora.

7- Colocou-se o material em jarras de Coplin com “working strength stop/wash buffer”, sob agitação e fez-se, a seguir, incubação por 10 minutos

à temperatura ambiente, seguida por três lavagens (cinco minutos cada) com PBS.

8- Fez-se novo bloqueio com soro albumina bovina (BSA) 2% diluída em PBS, por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se a três lavagens, de três minutos, com PBS.

9- Após a secagem das lâminas, fez-se a aplicação do conjugado anti-digoxigenina. O material foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e, após lavado por quatro vezes, por cinco minutos com PBS.

10- Fez-se a revelação da reação com 3'3 – Diaminobenzidina (DAB) diluída a 1:100, por três a seis minutos, observando-se ao microscópio. A seguir o material foi lavado com água destilada, três vezes, por um minuto e a quarta lavagem, com água destilada, por cinco minutos. A seguir o material foi lavado com PBS por cinco minutos.

11- Após os procedimentos acima, o material foi incubado com o anticorpo anti CK-19, diluído 1:100 em PBS com 1% de BSA e incubado “overnight” à temperatura de 4 °C. A seguir o material foi lavado, três vezes, por cinco minutos, com PBS.

12- Fez-se a incubação do material com o sistema de revelação Envision AP “anti mouse/rabbit”, por 30 minutos à temperatura ambiente, que foi seguida por três lavagens, de cinco minutos com PBS.

13- A revelação da reação foi feita com BCIP/NBT (“nitro blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3 indoyl phosphate, toluidine salt”), acompanhando ao microscópio. O material foi, a seguir, lavado em água destilada, por três vezes, três minutos cada vez.

14- Após os procedimentos descritos, o material foi desidratado em cadeia ascendente de etanol, diafanizado e montado com resina Permout (FISHER Scientific Fair Lawn, cód. SP15-100, NJ/USA) e lamínulas de vidro.

Como controles positivos das reações foram utilizados cortes histológicos de linfonodo reativo, pele com Doença de Bowen (controle de apoptose) e cortes histológicos de couro cabeludo normal e tricoepitelioma (para citoqueratina 19). Os controles negativos foram obtidos pela omissão da “working strength TdT Enzyme” e do anticorpo primário anti-citoqueratina 19, nos procedimentos.

De acordo com o protocolo utilizado, foi considerado como resultado positivo o aparecimento de coloração marrom acastanhada nos núcleos celulares para o método TUNEL e coloração azul escura citoplasmática para a citoqueratina 19. A reação foi analisada qualitativamente (positiva ou negativa) de acordo com a presença ou não de células marcadas simultaneamente, com os dois padrões descritos, e situadas na bainha radicular externa ao nível da protuberância folicular. O número total de folículos imunomarcados em cada corte histológico também foi contabilizado.

Especificação dos reagentes utilizados:

ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit cod. S7101 – CHEMICON INTERNATIONAL – Temecula, CA 92590.

Mouse monoclonal antibody anti-Cytokeratin 19 – cód. NCL-CK 19 – NOVOCASTRA LABORATORIES LTD (Benton Lane, UK).

Envision® Labelled Polymer – AP Mouse/Rabbit cód. K4017, DAKO CORPORATION (Carpinteria, CA/USA).

BCIP/NBT (nitro blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3 indoyl phosphate, toluidine salt) Substrate System, cód. K0598, DAKO CORPORATION (Carpinteria, CA/USA).

Protocolo para demonstração de expressão de caspase 3 clivada (Cysteiniyl aspartate- specific protease)

Caspases são proteases de cisteína (“c”). Isto é, têm um centro ativo de cisteína, da família ICE/Ced-3 e são sintetizadas sob a forma de precursores que necessitam ser clivados ao nível de resíduos contíguos de ácido aspártico para adquirirem atividade proteolítica (“asp-ase”; c + asp-ase = caspase). As caspases formam, portanto, uma cascata de “proteases de cisteína aspartato-específicas”. A ICE é a caspase 1; a CPP32/apopaina é a caspase 3. A família das caspases vem crescendo rapidamente. As caspases são consideradas como as moléculas que representariam a via efetora comum da apoptose.

Fez-se os procedimentos abaixo descritos para a demonstração de caspase 3 clivada:

- 1- Desparafinização, hidratação e lavagem do material como acima descrito.
- 2- Para a melhor exposição dos sítios antigênicos o material foi submetido a tratamento enzimático com 25 mg de tripsina (SIGMA Chemical Co, St Louis, MO/USA, cód. T-8253) acrescido de 134 mg cloreto de cálcio diluídos em

PBS 0,01M pH 7,4, por 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir fez-se lavagem em água corrente, destilada e em seguida com PBS 0,01 M pH 7,4.

3- Procedeu-se à incubação com anticorpo anti-caspase 3 clivada, diluído 1:100, em PBS 0,01M pH 7,4 com 1% BSA, “overnight” à 4 °C; a seguir fez-se três lavagens em PBS 0,01 M pH 7,4.

4- O material foi incubado com Envision AP, por 30 minutos à temperatura ambiente e, a seguir, lavado por três vezes em PBS 0,01 M pH 7,4.

5- Fez-se a revelação com BCIP/NBT, controlando ao microscópio, seguida por lavagem em água corrente e destilada.

6- O material foi contra-corado com “Nuclear Fast Red”, desidratado em cadeia ascendente de etanol e montado com resina Permount (FISHER Scientific Fair Lawn, cód. SP15-100, NJ/USA) e lamínulas de vidro.

De acordo com o protocolo utilizado, foi considerado como resultado positivo o aparecimento de coloração azul escuro nos sítios de acoplamento antígeno-anticorpo.

Como controle positivo para a reação foram utilizadas amostras teciduais de linfonodo reativo e pele com Doença de Bowen. O controle negativo das reações foi obtido por omissão do anticorpo primário.

Especificação dos reagentes utilizados:

- Anticorpo primário: Cleaved Caspase-3 (Asp175), CELL SIGNALING, cód. 9661 (Beverly, MA/ USA).
- Anticorpo secundário: DAKO Envision Alkaline Phosphatase Mouse/Rabbit, cód. K4017, DAKO Corporation (Carpinteria, CA/USA).

Substrato: BCIP/NBT NBT (nitro blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3 indoyl phosphate, toluidine salt) Substrate System, cód. K0598, DAKO Corporation (Carpinteria, CA/USA).

4.4 Correlação da incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, com o grau de imunodeficiência

A relação entre a proporção de folículos pilosos com dupla marcação (CK19/TUNEL) e a contagem de células CD4+ no sangue dos casos, foi obtida através do coeficiente de correlação de Pearson. Estabeleceu-se o nível de significância em 95%. Considerou-se como evidência do grau de imunodeficiência a contagem de linfócitos T CD4+ no sangue dos pacientes.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13 de agosto de 2003, sob o número 336/03.

5. RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica

O nível desejado (inserção do MEP) foi alcançado em todos os cortes histológicos avaliados. A média do número de unidades foliculares encontrada foi de 9,2 ($\pm 1,1$) nos casos e de 9,8 ($\pm 1,1$) nos controles. Do ponto de vista morfológico, houve uma maior desorganização das fibras colágenas perifoliculares nos casos quando comparados aos controles. **(Figura 6)** A média do número total de folículos nos casos foi de 23,7($\pm 7,1$) nos casos e de 20,5 ($\pm 3,0$) nos controles. Classificando-se os folículos em terminais e velos, observamos uma maior proporção de folículos terminais nos casos 95% ($\pm 2\%$) do que nos controles 80% ($\pm 1\%$). Quando classificamos os folículos de acordo com a fase do ciclo folicular, observamos uma menor proporção de folículos anágenos nos casos 91% ($\pm 2\%$) do que nos controles 96% ($\pm 1\%$). A proporção de folículos catágenos foi semelhante nos casos 2% ($\pm 3\%$) e nos controles 2% ($\pm 4\%$). A proporção de folículos telógenos foi maior nos casos 7% ($\pm 6\%$) do que nos controles 2% ($\pm 12\%$). **(Figura 7)** A média no número de unidades telógenas germinativas (TGU) e de tratos fibrosos residuais (TFR) foi de 0,7 ($\pm 0,7$) e 0,1 ($\pm 0,4$) nos casos e de 0,7 ($\pm 0,5$) e 0,2 ($\pm 0,4$) nos controles, respectivamente. Não foi encontrado infiltrado inflamatório perifolicular em nenhum dos casos e dos controles. **(Tabelas 3 e 4)**

Figura 6 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 13). Corte transversal de couro cabeludo ao nível da inserção do músculo eretor do pêlo. Observa-se desorganização das fibras colágenas perifoliculares (→). (Tricrômico de Gomori; aumento original x40).

Figura 7 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 6). Corte transversal de couro cabeludo ao nível da inserção do músculo eretor do pêlo. Observa-se o aumento do número de folículos telógenos e de unidades telógenas germinativas (→). (Tricrômico de Gomori; aumento original x40).

Tabela 3 - Resultados da análise histopatológica / morfométrica nos pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial (casos).

CASO	Nº UF	Nº TOTAL FOLÍCULOS	Nº FOLÍCULOS TERMINAIS	Nº FOLÍCULOS VELOS	Nº FOLÍCULOS ANÁGENOS	Nº FOLÍCULOS CATÁGENOS	Nº FOLÍCULOS TELÓGENOS	Nº TGU	Nº TFR	INF. INFLAMATÓRIO	IDENTIFICAÇÃO MEP
1	10	26	26	0	23	0	3	1	0	Ausente	+
2	10	34	32	2	33	0	1	1	0	Ausente	+
3	10	15	15	0	12	1	2	0	0	Ausente	+
4	10	30	29	1	30	0	0	2	0	Ausente	+
5	8	25	24	1	22	2	1	0	0	Ausente	+
6	10	19	18	1	13	1	5	1	0	Ausente	+
7	8	13	13	0	13	0	0	0	0	Ausente	+
8	10	34	33	1	33	1	0	1	1	Ausente	+
9	8	22	21	1	22	0	0	0	0	Ausente	+
10	10	19	17	2	18	0	1	1	0	Ausente	+
11	7	25	25	0	22	0	3	2	1	Ausente	+
12	8	19	15	4	17	1	1	0	0	Ausente	+
13	9	14	12	2	13	0	1	1	0	Ausente	+
14	10	29	27	2	25	0	4	1	0	Ausente	+
15	10	32	31	1	29	0	3	0	0	Ausente	+
Média ± DP	9,2 ± 1,1	23,7 ± 7,1						0,7 ± 0,7	0,1 ± 0,4		
% dos tipos de folículos pilosos ±DP			95% ± 2%	5% ± 4%	91% ± 2%	2% ± 3%	7% ± 6%				

UF - unidades foliculares; TGU - unidades telógenas germinativas; TFR - tratos fibrosos residuais; MEP - músculo eretor do pêlo; + identificado

Tabela 4 - Resultados da análise histopatológica / morfométrica de couro cabeludo de indivíduos hígidos sem alopecia (controles).

CASO	Nº UF	Nº TOTAL FOL.	Nº FOL. TERMINAIS	Nº FOL. VELOS	Nº FOL. ANÁGENOS	Nº FOL. CATÁGENOS	Nº FOL. TELÓGENOS	Nº TGU	Nº TFR	INFILT. INFLAMATÓRIO	IDENTIFI-CAÇÃO MEP
1	9	23	20	3	22	1	0	0	0	Ausente	+
2	10	20	18	2	19	0	1	0	1	Ausente	+
3	8	17	15	2	16	0	1	1	0	Ausente	+
4	10	19	15	4	17	2	0	1	0	Ausente	+
5	11	17	16	1	17	0	0	0	0	Ausente	+
6	9	25	19	6	25	0	0	1	0	Ausente	+
7	10	19	13	6	18	1	0	1	0	Ausente	+
8	9	16	12	4	15	1	0	0	1	Ausente	+
9	12	22	15	7	21	0	1	1	0	Ausente	+
10	10	25	20	5	24	0	1	1	0	Ausente	+
11	11	21	18	3	21	0	0	1	0	Ausente	+
12	9	22	17	5	22	5	0	1	0	Ausente	+
Média ± DP	9,8 ± 1,1	20,5 ± 3,0						0,7 ± 0,5	0,2 ± 0,4		
% dos tipos de folículos pilosos ± DP			80% ± 1%	20%	96% ± 1%	2% ± 4%	2% ± 12%				

UF - unidades foliculares; TGU - unidades telógenas germinativas; TFR - tratos fibrosos residuais; MEP - músculo eretor do pêlo; + Identificado; FOL. - folículos

5.2 Demonstração de apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular

As células que exibiram dupla marcação positiva apresentavam o núcleo marcado pelo cromógeno marrom (reação de TUNEL) e o citoplasma marcado em azul pelo cromógeno BCIP/NBT (expressão de CK19).

Foram encontradas células com dupla marcação TUNEL/CK19 positivas na bainha radicular externa ao nível da protuberância folicular, em pelo menos um folículo por corte histológico, em 80% dos casos e em 25% dos controles. **(Figuras 8, 9, 10, 11 e 12)** A média percentual de folículos imunoreagentes (positivos) encontrados em cada corte histológico foi de 48% ($\pm 7\%$) nos casos e de 26% ($\pm 13\%$) nos controles **(Tabela 5)**.

Queratinócitos situados na BRE, TUNEL positivos e CK19 negativos, foram observados, tanto nos casos como nos controles. **(Figura 13)** Em alguns cortes histológicos foram observados folículos com células CK19+ e/ou CK19/TUNEL + ao redor de toda circunferência folicular e não somente na protuberância. **(Figura 14)**

As células com expressão de caspase 3 clivada apresentavam o citoplasma marcado em azul (cromógeno BCIP/NBT). Foram encontradas células imunoreativas para o anticorpo anti-Caspase 3 na protuberância folicular em pelo menos um folículo piloso por corte histológico em 61% dos casos avaliados e em 16% dos controles. A média percentual de protuberâncias foliculares imunorreagentes encontradas nos casos positivos, foi de 99% ($\pm 6\%$) nos casos e de 100% ($\pm 6\%$) nos controles. **(Figura 15)** Em

dois casos, a amostra tecidual não foi considerada representativa para a investigação da caspase 3 clivada, devido a não identificação da protuberância folicular, no corte histológico avaliado.

As tabelas 5 e 6 demonstram os resultados da dupla marcação TUNEL/CK19 e de caspase 3 clivada de células da BRE da protuberância folicular nos casos de alopecia difusa, não cicatricial de doentes HIV-1 positivos e grupo controle normal, respectivamente.

Figura 8 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 6). Detalhe da desintegração da bainha de mielina de um folículo telógeno. (Tricrômico de Gomori; aumento original x100).

Figura 9 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 12). Corte transversal de couro cabeludo. Observa-se dupla marcação CK19 (BCIP/NBT, azul) e TUNEL (DAB, marrom) em células da bainha radicular externa de dois folículos pilosos (→); (aumento original x100).

Figura 10 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 12). Detalhe da dupla marcação CK19/TUNEL de células da bainha radicular externa de folículo piloso; (aumento original x400).

Figura 11 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 12). Corte transversal de folículo piloso exibindo células CK19 (BCIP/NBT, azul) e TUNEL (DAB, marrom) positivas na bainha radicular externa ao nível da protuberância folicular; (aumento original x1000).

Figura 12 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 6). Corte transversal de couro cabeludo. Presença células CK19+ apoptóticas (TUNEL positivas) na bainha radicular externa, que delimitam as projeções epiteliais características da protuberância folicular; (aumento original x400).

Figura 13 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 5). Detalhe da BRE de um folículo piloso exibindo queratinócitos apoptóticos (núcleos TUNEL positivos – DAB, marrom) que não expressam CK 19 no citoplasma (→) e células da camada basal com dupla marcação; (aumento original $\times 1000$).

Figura 14 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 1). Corte transversal de folículo piloso exibindo células com dupla marcação CK19 (BCIP/NBT, azul) e TUNEL (DAB, marrom) em toda a circunferência da bainha radicular externa de folículo piloso; (aumento original $\times 400$).

Figura 15 - Alopecia difusa não-cicatricial de paciente HIV-1+ (caso 1). Corte transversal de couro cabeludo ao nível da protuberância. Observa-se queratinócitos apoptóticos (→) na bainha radicular externa, evidenciados pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada; (aumento original x400).

Tabela 5 – Apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular, evidenciada pela técnica de dupla marcação TUNEL/CK19 e pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada, na alopecia difusa não cicatricial de pacientes HIV-1 positivos.

Caso	TUNEL/CK19			CASPASE 3 CLIVADA		
	Nº de PF	Nº PF positivas	% PF positivas	Nº de PF	Nº PF positivas	% PF positivas
1	10	6	60	17	17	100
2	9	4	44	19	19	100
3	2	2	100	0	0	0
4	24	8	33	19	19	100
5	23	7	30	15	15	100
6	11	9	82	12	12	100
7	15	7	47	14	13	93
8	13	6	46	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	25	25	100
12	9	6	67	0	0	0
13	27	7	26	0	0	0
14	25	6	24	21	21	100
15	35	30	86	32	32	100
Total	203	98	48	174	173	99

TUNEL/CK19 – dupla marcação com TUNEL e anticorpo anti-citoqueratina 19; No – número; PF – protuberância folicular

Tabela 6 – Apoptose de células tronco-foliculares e células amplificadoras transitórias, da bainha radicular externa da protuberância folicular evidenciada pela técnica de dupla marcação TUNEL/CK19 e pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada em grupo controle de couro cabeludo normal.

Caso	TUNEL/CK19			Caspase 3 clivada		
	Nº de PF	Nº PF positivas	% PF positivas	Nº de PF	Nº PF POSITIVAS	% PF POSITIVAS
1	23	0	0	23	0	0
2	21	6	30	20	0	0
3	27	7	26	17	0	0
4	19	0	0	19	0	0
5	17	0	0	17	0	0
6	25	0	0	25	0	0
7	19	0	0	19	19	100
8	16	0	0	16	16	100
9	22	0	0	22	0	0
10	25	0	0	25	0	0
11	21	0	0	21	0	0
12	22	0	0	22	0	0
Total	257	13	5	246	35	14

TUNEL/CK19 – dupla marcação com TUNEL e anticorpo anti-citoqueratina 19; Nº – número; PF – protuberância folicular

5.3 Correlação da incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial, com o grau de imunodeficiência

Não houve correlação entre a proporção de folículos com dupla imunomarcagem e os níveis de linfócitos T CD4+ no sangue dos pacientes (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação da incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais da protuberância folicular no couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial, com o nível de células CD4+ apresentado pelos pacientes.

OBSERVAÇÃO	% PF IMUNOMARCADAS (CK19/TUNEL+)	NÍVEIS CÉL. CD4 (cél/mm ³)
1	60	356
2	44	401
3	100	200
4	33	273
5	30	300
6	82	66
7	47	215
8	46	398
9	0	150
10	0	601
11	0	333
12	67	200
13	26	301
14	24	267
15	86	480

PF – protuberâncias foliculares; Cél. CD4 – linfócitos CD4
Coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0$)

6. DISCUSSÃO

A análise histológica da região occipital do couro cabeludo do grupo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial revelou um número total de folículos ($23,7 \pm 7,1$) pouco maior que o do grupo controle ($20,5 \pm 3,0$). Entretanto, ambos os grupos apresentaram menor número de folículos pilosos que o descrito por Sperling & Lupton (1995)¹¹² ao analisar cortes transversais de couro cabeludo normal de biópsias obtidas com “punch” de quatro milímetros.

Poderíamos relacionar essa diferença com a localização da área de couro cabeludo examinada (região occipital). Esse local, e não o vértice, foi intencionalmente escolhido para ser excluída a possibilidade de provável alopecia androgenética incipiente, que pudesse estar ocorrendo nos pacientes dos grupos em estudo. Entretanto, os autores acima referidos demonstraram não haver diferenças morfométricas de folículos pilosos das duas regiões do couro cabeludo (vértice e occipício). Desse modo, interpretamos essa diferença como uma variação aleatória, dentro da normalidade.

Observamos uma desorganização, do ponto de vista estrutural, dos folículos pilosos do grupo de casos. Essa desorganização foi refletida no menor número de unidades foliculares identificáveis nos casos, quando comparados com os controles. Essa desorganização estrutural é mais comumente encontrada em alopecias cicatriciais. No entanto, em determinadas formas de alopecias não cicatriciais, em estágios mais

avançados, como a androgenética e a areata, ela também pode ser encontrada.¹¹³

Quando comparados os dois grupos de estudo, observamos que a proporção de folículos terminais e velos, em ambos os grupos, foi a esperada para o couro cabeludo normal.¹¹³ A proporção de folículos anágenos foi de 95% nos casos e de 96% nos controles. A proporção de folículos telógenos nos casos (7%) e nos controles (2%) está dentro dos limites da normalidade. No couro cabeludo normal a proporção de folículos telógenos pode variar de 0 – 15%.¹¹⁴

Uma vez que a infecção pelo HIV é uma doença crônica e consumptiva, poderíamos relacionar a alopecia difusa não cicatricial observada nos doentes, como provável eflúvio telógeno. Entretanto, este pode ser afastado, uma vez que a proporção de folículos telógenos deve ser maior que 25% nessa condição.¹¹²

Outras formas de alopecia, que devem ser consideradas na diagnose diferencial da alopecia difusa não cicatricial em estudo, são as relacionadas com a sífilis. A alopecia “essencial” difusa da sífilis secundária, devido a perda de fios telógenos, pode ser afastada, pois exhibe quadro histopatológico semelhante ao do eflúvio telógeno (com mais de 25% de folículos pilosos em fase telógena). A alopecia inflamatória difusa da sífilis pode ser também afastada, uma vez que, nesta condição ocorre processo inflamatório expressivo, semelhante ao observado na alopecia areata, com infiltrado inflamatório mononuclear acometendo 100% dos folículos

representados, maior proporção da relação folículos catágenos/telógenos e presença de folículos pilosos miniaturizados.¹¹²

Ainda, na análise histopatológica e morfométrica dos casos estudados, observamos média de 2% de folículos catágenos no couro cabeludo dos dois grupos, o que não difere do relatado para as condições de normalidade.¹¹²

Apesar dos resultados da análise histopatológica e morfométrica do couro cabeludo dos casos não diferirem, de modo expressivo, do grupo controle, todos os doentes apresentavam alterações capilares objetivas, como a alteração da textura e rarefação difusa dos cabelos. Esse quadro clínico aproxima-se daquele descrito para a alopecia senil.^{112,115} Nesse tipo de alopecia ocorre diminuição progressiva da densidade e afilamento dos cabelos, a partir dos 50 anos de idade. O quadro histopatológico descrito é semelhante ao por nós observado no grupo de doentes HIV-1 positivos, com alopecia difusa não cicatricial. Há leve diminuição do número de folículos pilosos, proporção adequada de pelos terminais e velos, e o número de folículos telógenos apresenta-se dentro dos limites descritos para a normalidade (menos de 20%). Na alopecia senil, não há diferenças entre os achados de biópsia tomadas do vértice e da região occipital do couro cabeludo.¹¹²

Embora semelhante, tanto pelo quadro clínico como pelo histopatológico, a alopecia difusa não cicatricial de doentes HIV-1 positivos deve ser entidade distinta da alopecia senil. A condição objeto de nosso

estudo ocorre em doentes HIV-1 positivos de faixa etária menor. A idade do grupo por nós estudado variou de 22 a 44 anos (média de 35,3 anos).

Smith et al.⁶, ao estudarem grupo de 10 pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não-cicatricial, relataram a presença de queratinócitos apoptóticos na bainha radicular externa, ao nível da protuberância folicular. Os autores consideraram que a apoptose de queratinócitos da BRE de folículos pilosos, seria fator de distinção da alopecia difusa da infecção pelo HIV-1, de outras condições de estresse, causadoras de provável eflúvio telógeno.

Demonstramos, através de técnica de dupla marcação (CK19/TUNEL), que ocorre apoptose das células-tronco foliculares e células amplificadoras transitórias, da BRE da protuberância folicular do couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos em uma proporção maior do que em controles sadios.

Devido à dificuldade em se obter marcadores imunohistoquímicos, grande parte dos trabalhos com células-tronco utiliza a marcação com radioisótopos. A CK19 pode ser considerada um marcador de indiferenciação celular, porém sua expressão não é restrita às células-tronco. Também é expressa pelas células amplificadoras transitórias, que dão origem ao germe secundário. Portanto, em nosso trabalho, não podemos afirmar que a apoptose encontrada foi restrita exclusivamente às células-tronco foliculares. Em grande parte dos casos, assim como dos controles, foram observadas células CK19 positivas ao redor de toda BRE e não apenas nas projeções da protuberância folicular. Esse achado pode ser

justificado admitindo-se que o músculo eretor do pêlo pode envolver toda circunferência folicular e não somente alcançar o FPS em sua face posterior. Esse fato sugere que a interação entre protuberância-MEP é de fundamental importância na manutenção do fenótipo das células da protuberância folicular.¹¹⁶

Realizamos também a demonstração de apoptose através do anticorpo anti-caspase 3 clivada, para corroborar as observações pela marcação com o método do TUNEL. Escolhemos a caspase 3 clivada como marcador de apoptose, uma vez que essa caspase está envolvida nos processos de apoptose deflagrados tanto por mecanismos extrínsecos (via receptores de membrana) como pela via mitocondrial.⁸⁶ Entretanto, não realizamos técnica de dupla marcação, uma vez que a expressão de CK19 e da caspase 3 clivada são citoplasmáticas. Apesar de tentativas com o uso de diferentes cromógenos, os resultados não foram satisfatórios para assegurar a demonstração inequívoca de ocorrência concomitante de dupla marcação. Entretanto, observamos que ocorria imunomarcação de células da BRE ao nível da protuberância folicular, que correspondia à localização observada quando da dupla marcação CK19/TUNEL. Outra dificuldade encontrada foi a representada pelos níveis adequados dos cortes histológicos para a representação das protuberâncias foliculares. Essas estruturas foram representadas em somente cerca de três a quatro lâminas com cortes consecutivos, de cada espécime estudado. Através do exame ao microscópio das lâminas dos cortes de parafina sem coloração, pudemos escolher os mais representativos da protuberância, pela identificação da

inserção do MEP nessas estruturas. Priorizamos os cortes mais representativos para a realização da técnica de dupla marcação (CK19/TUNEL). A apoptose de queratinócitos da BRE, demonstrada pelo anticorpo anti-caspase 3 clivada, foi observada em 61% dos casos e 16% dos controles. Pela técnica da dupla marcação CK19/TUNEL a frequência de apoptose de células CK19+ foi de 80% e 25% respectivamente. No nosso estudo, a técnica do TUNEL mostrou-se mais sensível para a demonstração de apoptose.

Kishimoto et al. (1998)¹¹⁷ demonstraram apoptose de células foliculares, pela técnica do TUNEL, em três espécimes de couro cabeludo humano normal, obtidos durante cirurgia cutânea. Os autores não especificaram a região do couro cabeludo estudada. Observaram células TUNEL positivas na camada de Henle próximo do bulbo folicular, em células cuticulares da bainha radicular interna e ao nível do istmo em células logo abaixo da camada córnea. Os autores, entretanto, não descrevem apoptose de células tronco-foliculares, presentes na BRE ao nível da protuberância folicular.

A apoptose de células-tronco, apesar de parecer paradoxal, é encontrada, de forma fisiológica, em outros tecidos com poder de auto-renovação. No folículo piloso de murinos está correlacionada com o remodelamento estrutural que ocorre durante a fase catágena.⁵ Até que ponto a apoptose encontrada na alopecia difusa dos doentes HIV-1 positivos, estaria relacionada os seus mecanismos patogénéticos ou simplesmente representaria uma alteração do ciclo folicular, com maior

regressão catágena dos folículos, ainda não está totalmente esclarecido. A análise morfométrica do couro cabeludo do grupo em estudo não favorece essa última possibilidade, uma vez que não encontramos aumento da proporção de folículos catágenos nos casos estudados.

Smith et al. (1996)⁶ baseados no fato da protuberância também ser o sítio folicular mais acometido na doença enxerto *versus* hospedeiro (DEVH),^{22,23} onde as células-tronco são o principal alvo, levantaram a hipótese de que uma reação auto-imune (DEVH-símile) pudesse ser um dos mecanismos envolvidos na patogênese da infecção pelo HIV, incluindo a alopecia. Pudemos demonstrar que realmente há apoptose nas células-tronco foliculares do couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial, em uma proporção maior do que em controles sadios. Entretanto, em nenhuma de nossas observações foi encontrado infiltrado inflamatório ao nível da protuberância, como seria esperado numa reação DEVH-símile.

Doze dos 15 doentes estudados estavam recebendo esquema terapêutico anti-retroviral. De acordo com a literatura, a única droga que pode compor esses esquemas terapêuticos e relacionada com distúrbios capilares é o indinavir. Devido à semelhança existente na sequência de aminoácidos entre a protease do HIV-1 e a proteína citoplasmática ligadora de ácido retinóico tipo 1 (“cytoplasmic retinoid acid binding protein type 1” ou CRABP-1), os pacientes HIV-1 positivos em uso de indinavir podem apresentar efeitos colaterais retinóide-símiles como queilite, xerodermia, granulomas piogênicos, paroníquia, lipoatrofia e alopecia. Esses efeitos

colaterais dermatológicos são causa de interrupção do tratamento em 10% dos pacientes. De acordo com a literatura, a alopecia ocorre em 12% dos pacientes em uso de indinavir, tem início nos seis primeiros meses de tratamento e acomete inicialmente os pêlos dos membros inferiores e, em menor escala, o couro cabeludo.^{1,16,118,119} O mecanismo provável de atuação da droga, segundo os autores, seria um eflúvio telógeno, devido à alteração do ciclo folicular. Ginarte et al.¹⁷, em 2002, baseados no fato da alopecia indinavir-induzida nem sempre estar associada com outras manifestações cutâneas retinóide-símiles e no fato da gravidade do quadro não estar correlacionada com a severidade das outras manifestações muco-cutâneas, ou com o grau de imunodepressão, levantou a hipótese do mecanismo retinóide-símile não ser o único envolvido nesse tipo de alopecia. Nossa observação número seis havia interrompido há um mês o uso do indinavir quando da colheita da biópsia de couro cabeludo para exame. A droga tinha sido utilizada por um período de aproximadamente seis meses. De acordo com nossos critérios de inclusão, esse paciente não apresentava uma queda acentuada de cabelos, mas relatava uma diminuição de volume e alteração de textura dos mesmos. O paciente também não apresentava outras manifestações cutâneas relacionadas com o efeito retinóide-símile. Os cortes transversais de seu couro cabeludo apresentaram imunomarcagem para CK19/TUNEL (82% das protuberâncias foliculares representadas/corte) e caspase 3 clivada (100% das protuberâncias foliculares representadas/corte). É possível que o outro mecanismo sugerido por

Ginarte et al.¹⁷, envolvido na alopecia indinavir-induzida, seja a indução da apoptose das células indiferenciadas da protuberância folicular.

Poderíamos relacionar a maior atividade apoptótica das células tronco-foliculares da BRE com o nível de imunossupressão dos doentes. Entretanto, quando tomamos a contagem de linfócitos CD4+ no sangue dos pacientes como parâmetro de intensidade de imunossupressão não encontramos correlação com a frequência de apoptose de queratinócitos da BER de folículos pilosos.

Na infecção pelo HIV-1 e AIDS são descritas alterações nos mecanismos controladores da apoptose celular, como o aumento de expressão de receptores de membrana como o Fas-L, diminuição de expressão de proteínas anti-apoptose como o Bcl-2 e aumento de expressão de proteínas pró-apoptose como o Bax.⁸⁶ A lise de linfócitos T CD4+ é propiciada por mecanismos dependentes, não somente da infecção celular pelo HIV-1, mas também por atuação de proteínas virais e ativação dos receptores de morte celular, como o aumento da expressão do Fas (CD95), Fas-L (CD95L) e do TNFR-TNF/TRAIL; ou através da via mitocondrial: fosforilação da proteína p53, aumento da expressão do Bax, dissipação do potencial transmembrana, liberação do citocromo c e ativação das caspases.⁹¹⁻⁹⁴

Devido às alterações das moléculas indutoras da apoptose, ao aumento dos níveis de interleucinas (4, 6, 10 e TNF alfa), e ao estresse oxidativo que ocorre na infecção pelo HIV-1, nossa hipótese inicial era de que uma alteração na expressão de genes pudesse levar a um quadro de

auto-imunidade, no qual as células-tronco foliculares fossem induzidas à apoptose pela ação citotóxica das células inflamatórias envolvidas, como o sugerido por Smith et al. (1996)⁶. Uma vez que nenhuma de nossas observações apresentou infiltrado inflamatório junto da protuberância folicular, torna-se improvável que um quadro de foliculite citotóxica DEVH-símile seja o responsável pela indução da apoptose e pela alopecia desses pacientes. Além disso, a agressão do reservatório de células-tronco foliculares por células inflamatórias, provavelmente, iria culminar numa alopecia de caráter inflamatório, seguida de alopecia de tipo cicatricial, o que não se observa nesses pacientes.

Excluindo-se a possibilidade de apoptose das células da protuberância folicular ser deflagrada por mecanismos dependentes de receptores pró-apoptóticos de membrana celular (via extrínseca da apoptose), podemos postular que o processo ocorreria pela via mitocondrial. Existem fatores relacionados ao HIV-1, como a proteína Vpr, presente no nucleocapsídeo do HIV, que é capaz de induzir a ativação direta da família das caspases.¹²⁰ Além de sua ação indutora da apoptose, essa pequena (14Kd) proteína acessória é considerada uma espécie de monitora e desempenha funções como: (a) auxiliar no processo de replicação viral em células que não estejam em replicação, através de sua ligação com a carioferina- α ; (b) induzir a parada do ciclo celular, através de sua ligação com o regulador positivo (MOV34) do complexo ciclina B p34, essencial para a transição da fase G2 para M; (c) estimular a expressão de genes através da interação física com fatores de transcrição, e/ou através de suas

consequências sobre o ciclo celular.^{121,122} Jacot et al ¹²³, em 2000, demonstraram que a Vpr induz a apoptose através de sua interação física direta com o translocador da adenina nucleotídeo (TAN), um componente da membrana mitocondrial externa (na mesma localização do Bax), levando à alteração da permeabilidade, ruptura da membrana e liberação de agentes apoptogênicos.

Uma explicação plausível, na tentativa de correlacionarmos a infecção pelo HIV-1 com o quadro de alopecia difusa não cicatricial, onde encontramos apoptose de células da BRE ao nível da protuberância folicular, na ausência de agressão inflamatória local, seria o da atuação do próprio vírus através de um componente como a Vpr. Através de sua atuação direta, essa proteína viral seria capaz de induzir a parada do ciclo celular das células-tronco foliculares na fase G2, o que, por si só, já explicaria a alteração do ciclo folicular levando à alopecia. Através de sua interação com componentes da membrana mitocondrial (com consequente aumento da expressão de Bax e diminuição da expressão de Bcl-2) induziria a apoptose celular na BRE da protuberância folicular.

Devemos levar em consideração que a apoptose, conforme já exposto, é um fenômeno efêmero e que sua aferição apenas através de um método morfológico, como o que utilizamos, é difícil. Logo, o que conseguimos identificar é apenas uma pequena amostra momentânea de um fenômeno que, provavelmente, está ocorrendo em larga escala.

Indução de apoptose relacionada a outro fator do HIV-1 foi descrito por Bin Shi et al.¹²⁴, no qual a proteína viral Tat aliada ao estresse oxidativo

relacionado com os altos índices de TNF- α , induzem a apoptose de células neuronais em pacientes infectados pelo HIV-1 com quadro de demência.

Corroborando nossa hipótese, a família das caspases, que constituem o braço efetor da apoptose, estão diretamente relacionadas com a apoptose das células foliculares e possuem um papel fundamental no controle do ciclo folicular.¹²⁵

Embora nossa casuística seja pequena, em nosso trabalho demonstramos que a alopecia difusa não cicatricial encontrada em pacientes HIV-1 positivos seria resultante de interrupção do ciclo folicular que se manifesta através de alopecia difusa, de tipo não cicatricial, e tem como alteração histopatológica importante a apoptose de células da BRE dos folículos pilosos. Esse processo não exhibe características morfológicas de eflúvio telógeno observado em outras condições adversas. Demonstramos que parte da população de células indiferenciadas da protuberância entra em apoptose em uma proporção maior do que a encontrada em controles sadios. A incidência da apoptose não está relacionada com o grau de imunodepressão desses pacientes. Admitindo-se que a apoptose das células indiferenciadas da protuberância folicular esteja relacionada com a patogenia dessa alopecia, uma vez que não há substratos morfológicos que expliquem apoptose resultante de mecanismos de auto-imunidade, poderíamos considerar um fator solúvel capaz de induzi-la. Devido a sua capacidade de alterar o ciclo celular e de induzir a ativação das caspases, propomos a proteína viral Vpr como uma possível responsável pelo processo observado na alopecia difusa não cicatricial da infecção pelo HIV-1.

O nosso estudo sugere que a alopecia difusa não cicatricial que ocorre durante a infecção pelo HIV-1 se assemelha, sob o ponto de vista clínico e histopatológico, com a alopecia senil (Kligman, 1988; Sperling; Lupton, 1995). Como dessa alopecia, o quadro histopatológico exhibe alterações discretas que não o distingue, de modo expressivo, do couro cabeludo normal. Entretanto, a alopecia difusa não cicatricial dos doentes HIV-1 positivos caracterizou-se por apoptose das células indiferenciadas da BRE da protuberância folicular. No processo de envelhecimento cutâneo, ocorre apoptose de queratinócitos das camadas inferiores da epiderme, o que não se observa na epiderme de indivíduos jovens.¹²⁶ Esse processo poderia estar ocorrendo também nas células da BRE dos folículos pilosos. Um estudo da apoptose das células da BRE da protuberância folicular na alopecia senil seria interessante, para comparação com o observado na alopecia difusa não cicatricial dos pacientes HIV-1 positivos.

7. CONCLUSÕES

O quadro histopatológico da alopecia difusa não cicatricial de pacientes HIV-1 positivos caracterizou-se pela desorganização estrutural das unidades foliculares e maior número de folículos telógenos quando comparado ao couro cabeludo de indivíduos hígidos sem alopecia.

Ocorre apoptose de células indiferenciadas pluripotenciais (células tronco e células amplificadoras transitórias) na bainha radicular externa da protuberância folicular na alopecia difusa não cicatricial de pacientes HIV-1 positivos. Entretanto, a apoptose não parece ser resultante de quadro de foliculite citotóxica, uma vez que, não foram observadas alterações inflamatórias em todos os casos estudados.

O fenômeno da apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais (células-tronco e células amplificadoras transitórias) presentes na bainha radicular externa, na região da protuberância folicular, foi observado com uma frequência maior na alopecia difusa não cicatricial de pacientes HIV-1 positivos, do que no couro cabeludo de indivíduos hígidos, sem alopecia.

A incidência de apoptose das células indiferenciadas pluripotenciais (células-tronco e células amplificadoras transitórias), presentes na região da protuberância folicular, do couro cabeludo de pacientes HIV-1 positivos com alopecia difusa não cicatricial, não guardou relação com o grau de imunodepressão desses pacientes.

8. ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, cujo objetivo é identificar a causa específica da queda de cabelos em pacientes HIV positivos. Somente no final do trabalho poderemos concluir a presença de algum benefício para coletividade.

Como voluntário você será submetido à retirada de um fragmento (biópsia) de pele do couro cabeludo, de quatro milímetros. Esse procedimento é precedido da aplicação de anestesia local, que pode causar desconforto local, bem como pode haver um pequeno sangramento durante o ato da retirada do material.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, assim como terá o direito de permanecer atualizado sobre os resultados parciais obtidos. O principal investigador é o Dr. Carlos Baptista Barcaui, que pode ser encontrado no endereço R. Enéas de Carliho Aguiar 255, 3º andar, telefone 30829232.

É garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Assinatura do Paciente ou responsável

Assinatura do pesquisador responsável

Local e data

9. REFERÊNCIAS

- 1 Colebunders R, Bottieau E, de Mey I. Curly hair and lipodystrophy as a result of highly active antiretroviral treatment? *Arch Dermatol*. 2000; 136(8):1064-65.
- 2 Wiwanitkit V. Prevalence of dermatological disorders in Thai HIV-infected patients correlated with different CD4 lymphocyte count statuses: a note on 120 cases. *Int J Dermatol*. 2004; 43(4):265-8.
- 3 Calista D, Morri M, Stagno A, Boschini A. Changing morbidity of cutaneous diseases in patients with HIV after the introduction of highly active antiretroviral therapy including a protease inhibitor. *Am J Clin Dermatol*. 2002; 3(1):59-62.
- 4 Muller-Rover S, Rossiter H, Lindner G, Peters E. Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *J Invest Dermatol*. 1999; 4(3):272-7.
- 5 Ito M, Kizawa K, Iamada K, Cotsarelis G. Hair follicle stem cells in the lower bulge from the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at termination of catagen. *Differentiation*. 2004; 72:548-57.
- 6 Smith KJ, Skelton HG, De Russo D, Sperling L et al. Clinical and histological features of hair loss in patients with HIV-1 infection. *J Am Acad Dermatol*. 1996; 34(1):63-68.
- 7 Muñoz-Pérez MA, Rodríguez-Pichardo A, Camacho F, Colmenero MA. Dermatological findings correlated with CD4 lymphocyte counts in prospective 3 year study of 1161 patients with human

- immunodeficiency virus disease predominantly acquired through intravenous drug abuse. *Br J Dermatol*. 1998; 139(1):33-9.
- 8 Prose NS, Abson KG, Scher RK. Disorders of the nails and hair associated with human immunodeficiency virus infection. *Int J Dermatol*. 1992; 31:453-56.
 - 9 Chaisson RE, Gallant JE, Keruly JC, et al. Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS*. 1998; 12:29-33.
 - 10 Mouton Y, Alfandari S, Valette M, et al. Impact of protease inhibitors on AIDS defining events and hospitalizations in 10 french AIDS references centers. *AIDS*. 1997; 11(12):101-5.
 - 11 Hogg RS, Heath KV, Yip B, et al. Improved survival among HIV-infected individuals following initiation of antiretroviral therapy. *JAMA*. 1998; 279:450-4.
 - 12 Sepkowitz KA. Effect of HAART on natural history of AIDS-related opportunistic disorders. *Lancet*. 1998; 351:228-30.
 - 13 Stewart MI, Smoller BR. Alopecia universalis in HIV-positive patient: possible insight into pathogenesis. *J Cutan Pathol*. 1993; 20:180-3.
 - 14 Lefeuvre A, Quilichini R, Chaffanjon P, et al. Alopecia universalis in a homosexual man seropositive for the human immunodeficiency virus [letter]. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990; 3:1019.
 - 15 Schonwetter RS, Nelson EB. Alopecia areata and the acquired immunodeficiency syndrome-related complex [letter]. *Ann Intern Med*. 1986; 104:287.

- 16 Bouscarat F, Prevot MH, Matheron S. Alopecia associated with indinavir therapy. *N Eng J Med*. 1999; 341(8):618.
- 17 Ginarte M, Losada E, Prieto A, Lorenzo-Zuniga V. Generalized hair loss induced by indinavir plus ritonavir therapy. *AIDS*. 2002; 16(12):1695-96.
- 18 Barcaui CB, Piñeiro-Maceira J. Microanatomia transversal do couro cabeludo – técnica e indicações. *An Bras Dermatol*. 2001; 76(3):261-68.
- 19 Barcaui CB, Piñeiro-Maceira J. Protuberância Folicular (Bulge) – Aspectos Histológicos. Anais do 53^o Congresso Brasileiro de Dermatologia. Salvador-BA; 2000.
- 20 Costa, IMC. Alopecia androgenética: contribuição ao estudo morfométrico e de imuno-histoquímica em folículos pilosos. [Tese Doutorado em medicina – Dermatologia]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.
- 21 Cotsarelis G, Tung-Tien S, Lavker RM . Label retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit : implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell*. 1990; 61:1329-37.
- 22 Sale GE, Beauchamp MD, Akiyama M. Parafollicular bulges, but not hair bulb keratinocytes, are attacked in graft-versus-host disease of human skin. *Bone Marrow Transplantation*. 1994; 14:411-13.
- 23 Murphy GF, Lavker RM, Whitaker D, Korngold R. Citotoxic folliculitis in GvHD: evidence of follicular stem cell injury and recovery. *J Cutan Pathol*. 1991; 18:309-14.

- 24 Wright N, Alison M. The biology of epithelial cell populations. Oxford: Clarendon Press, 1984.
- 25 Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997; 88:287-98.
- 26 Cotsarelis G, Kaur P, Dhoually D, Henнге U, Bickenbach J . Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. *Exp Dermatol*.1999; 8:80-89.
- 27 Quensberry P, Levitt L. Hematopoeitic stem cells. *N Eng J. Med*. 1979; 301:819-23.
- 28 Bickenbach JR: Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res*. 1981; 60:1611-20.
- 29 Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun T-T, Lavker RM: Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 2000; 102:451-61.
- 30 Reynolds AJ, Jahoda CAB. Hair follicle stem cells? A distinct germinative epidermal cell population is activated in vitro by the presence of hair dermal papilla cells. *J. Cell Sci*. 1991; 99:373-85.
- 31 Montagna W, Chase HB. Histology and cytochemistry of human skin: X-irradiation of the scalp. *Am J Anat* .1956; 99:415-45.
- 32 Oliver RF. Ectopic regeneration of whisker in the hooded rat from implanted length of the vibrissa follicle wall. *J Embryol Exp Morphol*. 1967; 17: 27-34.

- 33 Oliver, RF. The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by the implantation of dermal papillae. *J Embryol Exp Morphol.* 1967; 18:43-51.
- 34 Ibrhaim L, Wright EA. A quantitative study of hair growth using mouse and rat vibrissal follicles. *J Embryol Exp Morphol.* 1982; 72:209-24.
- 35 Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci. (USA)* 1993; 90:7391-95.
- 36 Yang JS, Lavker RM, Sun TT. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. *J Invest Dermatol.* 1993; 101:652-59.
- 37 Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, *et al.* Cells within the bulge region of mouse hair follicle transiently proliferate during early anagen: Heterogeneity and functional differences of various hair cycles. *Differentiation.* 1994; 55:127-36.
- 38 Akiyama M, Dale BA, Sunn T-T, Holbrook KA. Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin; the fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1995; 105:844-50.
- 39 Morris RJ, Tryson KA, Wu KQ. Evidence that the epidermal targets of carcinogen action are found in the interfollicular epidermis or infundibulum as well as in the hair follicles. *Cancer Res.* 2000; 60:226-29.
- 40 Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM. Hair follicular stem cells: The bulge-activation hypothesis. *J Invest Dermatol.* 1991; 98:77s-78s.

- 41 Pinkus H. Embryology of hair. In W Montagna and RA Ellis. *The Biology of Hair Growth*. Primeira edição. New York: New York Academic Press;1958: 1-32.
- 42 Madsen, A. Studies on the “bulge” (Wulst) in superficial basal cell epitheliomas. *Arch Dermatol*. 1964; 89:698-08.
- 43 Narisawa Y, Hashimoto K, Khoda H. Characterization of Hair Follicle Bulge in Human Fetal Skin: The Human Fetal Bulge is a Pool of Undifferentiated Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1995; 105(6):844-50.
- 44 Lane EB, Wilson CE, Hughes BR, Leigh IM. Stem cells in hair follicles. Cytoeskeletal studies. *Ann NY Acad Sci*. 1991; 642:197-13.
- 45 Chuong CM. *Molecular biology intelligence unit 1*. Austin: R.G. Landes; 1998.
- 46 Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. Growth factors and cytokines in hair follicle development and the cycling: recent insights from animal models and the potential for clinical therapy. *Mol Med Today*. 1998; 2:460-67.
- 47 Lyle S, Christofidou SM, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of hair follicle stem cells. *J Cell Sci*. 1998; 111(pt21): 3179-88.
- 48 Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Taylor RS. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol*. 1997; 108:113-17.

- 49 Oshima H, Rochat A, Kedzig C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001; 104:233-45.
- 50 Amoh Y, Li L, Yang M, et al. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair follicle cells. *Proc Nat Acad Sci. (USA)* 2004; 101(36):1321-95.
- 51 Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, Wei Z-G, Yang J-S, Sun TT. Hair follicle stem cells. Their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol*. 1993; 101:16S-26S.
- 52 Morris RJ, Liu Y, Marles L et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004; 22:411-17.
- 53 Blanpain C, Lowry WC, Geoghegan A, Polak L, Fuchs C. Self-renewal, multipotency, and existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. 2004; 105:1493-99.
- 54 Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells. Properties, markers, and location. *Proc Nat Acad Sci. (USA)* 2000; 97:13473-75.
- 55 Ito M, Kizawa K, Toyoda M, Morohashi M. Label retaining cells in the bulge region are directed to cell death after plucking, followed by healing from the surviving hair germ. *J Invest Dermatol*. 2002; 119:1310-16.
- 56 Lindner G, Botchkarev VA, Botchkarev NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol*. 1997; 151:1601-17.

- 57 Mehregan DA, van Hale HM, Muller AS. Lichen planopilaris: clinical and pathologic study of forty-five patients. *J Am Acad.* 1992; 27:935-42.
- 58 Wilson CL, Burge SM, Dean D, Dawber RPR. Scarring alopecia in discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol.* 1992; 126:307-14.
- 59 Fujimora T, Ohta Y, Katsuoka K. Characterization of infiltrating T cells in human scalp explants from alopecia areata to SCID nude mice: possible role of the disappearance of CD8+ T lymphocytes in the process of hair regrowth. *J Dermatol.* 1999; 26(12):797-02.
- 60 Jaworsky C, Kligman AM, Murphy GF. Characterization of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: implications for pathogenesis. *Br J Dermatol.* 1992; 127:239-46.
- 61 Barcaui CB. Análise histológica e imunohistoquímica das células-tronco foliculares na alopecia androgenética [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 2001.
- 62 Cowper SE, Rosenberg AS, Morgan MB. An investigation of apoptosis in androgenetic alopecia. *Am J Dermatopathol.* 2002; 24(3):204-08.
- 63 Kossard S . Diffuse alopecia with stem cell folliculitis: chronic diffuse alopecia areata or a distinct entity? *Am J Dermatopathol.* 1999; 21(1):46-50.
- 64 Cohen J. Apoptosis: Mechanisms of life and death in the immune system. *J Allerg Clin Immunol.* 1999; 103(4):548-54.

- 65 Pettsch MC, Manherz HZ, Tschopp J. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends in Cell Biol.* 1994; 4: 37-41.
- 66 Lesauskite V, Epistolato MC, Ivanoviene L, Tanganelli P. Apoptosis of cardiomyocytes in explanted and transplanted hearts. Comparison of results from in situ TUNEL, ISEL, and ISOL reactions. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121(1):108-16.
- 67 Norris DA. Differential control of cell death in the skin. *Arch Dermatol.* 1995; 131(8):945-8.
- 68 Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17:1675-87.
- 69 Darnay BG, Aggarwal BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol.* 1997; 61:559-66.
- 70 Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995; 3:673-82.
- 71 Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996; 271:4961-65.
- 72 Memon SA, Hou J, Moreno MB, Zacharchuk CM. Apoptosis induced by a chimeric Fas/FLICE receptor: lack of requirement for Fas- or FADD-binding proteins. *J Immunol.* 1998; 160:2046-49.
- 73 Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature.* 1998; 392:296-00.

- 74 Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*. 1995; 81:495-04.
- 75 Hsu H, Shu H-B, Pan M-G, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996; 84:299-08.
- 76 Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD/homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85:817-27.
- 77 Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8A and caspase-8/b. *J Biol Chem*. 1997; 272:26953-58.
- 78 Medema JP, Scaffidi C, Kischek FC, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*. 1997; 16:2794-04.
- 79 Fujita E, Kouroku Y, Miho Y, Tsukahara R, Ishiura S, Momoi T. Wortmannin enhances activation of CPP32 (caspase-3) induced by TNF or anti-Fas. *Cell Death Differer*. 1998; 5:289-97.
- 80 Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, et al. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FAD-like domains. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1996; 93:7464-69.

- 81 Kuman S. The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29:393-96.
- 82 Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999; 274:17941-45.
- 83 Bossy-Wetzel E, Green DR. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem.* 1999; 274:17484-90.
- 84 Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1999; 96:8144-49.
- 85 Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53 dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science.* 1999; 284:156-9.
- 86 Badley A, Pilon A, Landay A, Lynch D. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood.* 2000; 96(9):2951-64.
- 87 Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997; 388:190-195.
- 88 Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994; 124:1-6.

- 89 Rosen A, Casciola-Rosen L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem.* 1997;64:50-54.
- 90 Oliveira J, Fleisher T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004; 4(6):497-503.
- 91 Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, et al. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1992; 76:1099-06.
- 92 Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Cross linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon and tumor necrosis factor secretion. *Blood.* 1994; 84:2622-31.
- 93 Hashimoto F, Oyaizu N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Modulation of Bcl-2 protein by CD4 cross-linking: a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2. *Blood.* 1997; 90:745-53.
- 94 Cicala C, Arthos J, Rubbert A, et al. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4 (+) T cells. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 2000; 97:1178-83.
- 95 Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF, Rubin RL. Antinuclear antibodies: diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988; 47:121-41.

- 96 Kopelman RG, Zola-Pazner S. Association of human immunodeficiency virus infection and autoimmune phenomena. *Am J Med.* 1988; 84:82-88.
- 97 Solinger AM, Adams LE, Friedman-Kien AE. AIDS and autoimmunity: mutually exclusive entities? *J Clin Immunol.* 1988; 8:32-42.
- 98 Dalgleish AG: What is role of autoimmunity in AIDS? *Autoimmunity.* 1993; 15:237-44.
- 99 Gentric A, Blaschek M, Julien C, et al. Nonorgan-specific autoantibodies in individuals infected by type 1 human immunodeficiency virus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991; 59:487-94.
- 100 van der Lelie J, Lange JM, Vos JJ. Autoimmunity against blood cells in human immunodeficiency virus infection. *Br J Haematol* 1987, 67:109-14.
- 101 Bardin T, Kuntz D. Necrotizing vasculitis in HIV infection. *Arthritis Rheum.* 1987; 30 (suppl 4):S105.
- 102 Winchester R, Bernstein DH, Fisher HD, Enlow R, Solomon G. The co-occurrence of Reiter's syndrome and acquired immunodeficiency. *Ann Intern Med.* 1987; 106:19-26.

- 103 Aguilar JR, Berman A, Espinoza LR. Artritis asociada a la infeccion por el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Mex Reum.* 1988; 3:109-13.
- 104 de Clerck LS, Couttenye MM, de Broe ME. Acquired immunodeficiency syndrome mimicking Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1988; 31:205-14.
- 105 MacCall CA, Cohen JJ. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1991; 97:111-4.
- 106 Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Eng J Med.* 1999; 341:491-7.
- 107 Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest.* 2000; 105:1493-99.
- 108 Narisawa Y, Hashimoto K, Khoda H. Immunohistochemical demonstration of keratin 19 expression in isolated human hair follicles. *J Invest Dermatol.* 1994; 103(2):191-5.
- 109 Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci.* 1996; 109(pt5):1017-28.
- 110 Stasiak PC, Purkis PE, Leigh IM, et al. Keratin 19: predicted aminoacid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *J Invest Dermatol.* 1989; 92:707-16.

- 111 McCloskey TW, Chavan S, Lakshmi-Tamma SM, Pahwa S. Comparison of seven quantitative assays to assess lymphocyte cell death during HIV infection: measurement of induced apoptosis in anti-Fas-treated Jurkat cells and spontaneous apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from children infected with HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998; 14:1413-22.
- 112 Sperling LC, Lupton GP. Histopathology of non-scarring alopecia. *J Cutan Pathol* 1995; 22:97-114.
- 113 Templeton SF, Santa Cruz DJ, Soloman AR. Alopecia: Histologic diagnosis by transverse sections. *Sem Diag Pathol*. 1996; 13(1):2-18.
- 114 Sum DT, Lui H, Martinka M, Bernardo O, Shapiro J. Computerized morphometry and three-dimensional image reconstruction in the evaluation of scalp biopsy from patients with non-cicatricial alopecias. *Br J Dermatol*. 2003; 148: 272-278.
- 115 Kligman AM. The comparative histopathology of male-pattern baldness and senescent baldness. *Clinics Dermatol* 1988; 6:108-18.
- 116 Barcaui CB, Piñeiro-Maceira J, Alchorne MMA. Arrector pili muscle: evidence of proximal attachment variant in terminal follicles of the scalp. *Br J Dermatol*. 2002; 146(4):657-8.
- 117 Kishimoto S, Shibagaki R, Nagata M, Takenaka H, Yasuno H. Detection of apoptosis in hair follicles and acrosyngium of normal human scalp skin by labeling of nick ends of fragmented DNA. *Arch Dermatol Res*. 1999; 291:300-302.

- 118 Harry TC, Matthews M, Salvary I. Indinavir use: associated reversible hair loss and mood disturbance. *Int J STD AIDS*. 2000; 11(7):474-6.
- 119 Calista D, Boschini A. Cutaneous side effects induced by indinavir. *Eur J Dermatol*. 2000; 10:292-6.
- 120 Basañez G, Zimmerberg J. HIV and Apoptosis: Death and the Mitochondrion. *J Exp Med*. 2001; 193(4):11-14.
- 121 Agostini I, Popov S, Li J, Dubrovsky L, Hao T, Bukrinsky M. Heat-shock protein 70 can replace viral protein R of HIV-1 during nuclear import of the viral preintegration complex. *Exp Cell Res*. 2000; 259-398.
- 122 Stewart SA, Poon B, Song JY, Chen IY. Human Immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis through caspase activation. *J Virol*. 2000; 74:3105-11.
- 123 Jacotot E, Ferri KF, El Hammel C, Brenner C, Druillennec S, Hoebeke J, Rustin P, Métivier D, Lenoir C, Geuskens M, et al. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 Viral Protein R and Bcl-2. *J Exp Med*. 2001; 193:509-19.
- 124 Shi B, Raina J, Lorenzo A, Busciglio J, Gabuzda D. Neuronal apoptosis induced by Tat protein and TNF- α : potentiation of neurotoxicity mediated by oxidative stress and implications for HIV-1 dementia. *J Neurovirol*. 1998; 4:281-90.

- 125 Sawaya ME, Blume-Peytavi U, Mullins DL, Nicholson DW, Keane RW.
Regulation of cell death in human hair follicle cells by caspases. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(4):572.
- 126 Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S,
Kalish RS. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and
telomerase. *Br J Dermatol.* 2004; 150: 56-63.