ISABELLA IBRAHIM DOCHE SOARES

**Estudo da substância P e do peptídeo relacionado ao gene
da calcitonina em amostras do couro cabeludo e séricas de
pacientes com líquen plano pilar e alopecia frontal fibrosante**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romiti

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soares, Isabella Ibrahim Doche

Estudos da substância P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina em amostras do couro cabeludo e séricas de pacientes com líquen plano pilar e alopecia frontal fibrosante / Isabella Ibrahim Doche Soares. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientador: Ricardo Romiti.

Descritores: 1.Neuropeptídeos 2.Substância P 3.Receptores de peptídeo relacionado com o gene de calcitonina 4.Inflamação neurogênica 5.Alopecia 6.Ensaio de imunoabsorção enzimática

USP/FM/DBD-518/15

Dedico esta tese a Deus, minha força maior e aos meus pais

Beatriz e José Carlos, meus maiores incentivadores.

Ao meu avô Prof. José Doche, por sempre me lembrar que a

medicina é um sacerdócio e a pesquisa, seu legado.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Ricardo Romiti, agradeço a paciência no ambulatório, durante o projeto e principalmente, nos momentos finais da tese. Agradeço a disposição sempre em ajudar e por acreditar em mim desde o início. Obrigada por contribuir para este sonho e pelos contatos entre as universidades ao longo de todos estes anos.

À Dra. Maria Hordinsky, agradeço o total apoio e o esforço contínuo desde a minha primeira visita à Universidade de Minnesota, sempre estimulando, disponibilizando recursos e acreditando no meu potencial. Obrigada por abrir as portas da universidade para mim e principalmente, pelas inúmeras oportunidades durante todos estes anos. Certamente sem você nada disso teria sido possível. Serei eternamente grata pelo seu carinho e amizade.

À Profa. Dra. Neusa Valente, agradeço os conhecimentos ensinados e a paciência comigo. Obrigada pelo carinho e pela imensa ajuda neste e em tantos outros projetos. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. George L. Wilcox, agradeço por disponibilizar equipe, recursos e treinamento para a confecção deste projeto e principalmente, por poder contar com a sua experiência técnico-científica.

Agradecimentos

Aos colegas do Ambulatório de Tricologia, residentes da Dermatologia do HC-FMUSP e Enf. Sandra Maria, pela paciência e por me ajudarem a recrutar os pacientes e a coletar as amostras.

Aos colegas da Universidade de Minnesota: Profa. Marna Ericson, Rebecca Speltz e Steve Schnell, pela assistência laboratorial e paciência durante estes anos.

À Profa. Dra Maria Notomi Sato e ao LIM-56, por disponibilizarem recursos técnicos para a confecção do projeto e principalmente, por sempre me incentivarem a seguir em frente.

À Profa. Dra Valéria Aoki, pelo constante incentivo desde o início do projeto e por auxiliar no contato entre as universidades.

Aos Profs. Drs. Cyro Festa Neto, José Antônio Sanches Júnior e Evandro Ararigbóia Rivitti, pelo apoio institucional para este projeto e principalmente, para o estabelecimento do vínculo educacional entre as universidades.

Ao Prof. Dr Paulo Ricardo Criado e às Profas. Dras Maria Notomi Sato e Raquel Leão Orfali, pelas sugestões para o projeto e por aceitarem participar da banca de qualificação.

A todos os pacientes participantes que contribuíram para este projeto em nome da ciência.

Agradecimentos às instituições responsáveis pelo apoio financeiro

Aos Departamentos de Dermatologia e Neurociências da Universidade de Minnesota (EUA), ao *Goltz Professorship* e ao CARF (*Cicatricial Alopecia Research Foundation*), pelo apoio financeiro e por tornarem possível a realização deste projeto interinstitucional.

*“A razão é o passo, o aumento da ciência, o
camínho, e o benefício da humanidade é o fim.”*

Thomas Hobbes, filósofo inglês (1588-1679)

Normatização adotada:

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	02
2. Objetivos.....	14
2.1 Gerais.....	14
2.2 Específicos.....	14
3. MÉTODOS.....	16
3.1 Casuística.....	16
3.1.1. Critérios de inclusão.....	16
3.1.2. Critérios de exclusão.....	17
3.2 Coleta das amostras.....	17
3.2.1. Preparo do exame histopatológico.....	18
3.2.2. Preparo da técnica de imunofluorescência direta.....	19
3.2.3. Preparo e processamento das amostras para a técnica de ELISA.....	19
3.2.4. Preparo da técnica de ELISA.....	20
3.3 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Dados demográficos e apresentação clínica dos pacientes	23
4.2 Sintomas e sinais inflamatórios ao exame físico.....	24
4.3 Exame histopatológico.....	27
4.4 Imunofluorescência direta.....	33
4.5 Técnica de ELISA (neuropeptídios em amostras do couro cabeludo).....	34
4.6 Técnica de ELISA (neuropeptídios em amostras séricas).....	37
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	44
7. ANEXOS.....	46
Anexo A - Cronograma.....	46
Anexo B - Classificação de Fitzpatrick.....	47
Anexo C - Aprovação do projeto de pesquisa – CAPPesq.....	48

Anexo D - Aprovação do projeto de pesquisa – Universidade de Minnesota (EUA).....	49
Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – paciente.....	50
Anexo F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – controle.....	53
Anexo G - <i>Checklist</i> para o investigador.....	55
Anexo H – Outros	58
8. REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	alopecia areata
AC	alopecia cicatricial
AFF	alopecia frontal fibrosante
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ed.	edição
<i>et al.</i>	e outros
FITC	fluoresceína isocianetada
HE	hematoxilina-eosina
IFD	imunofluorescência direta
LP	líquen plano
LPP	líquen plano pilar
n	tamanho da amostra
p.	página
Prof.	professor
rev.	revista
SP	substância P
TBS	tampão trizma base
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
v.	volume

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
pg	picograma
μ	micra
μg	micrograma
$\geq$	maior ou igual
$\leq$	menor ou igual
$<$	menor
$>$	maior
$=$	igual
X	vezes
%	por cento
°C	graus Celsius
-	ausente ou irrelevante
+	leve
++	moderado
+++	intenso

LISTA DE SIGLAS

BRA	Brasil
CARF	<i>Cicatricial Alopecia Research Foundation</i>
Dr (a)	Doutor / Doutora
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
IFN	Interferon
LPPAI	<i>Lichen Planopilaris Activity Index scoring system</i>
MD	<i>Medical Doctor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Maior)
MSH	<i>Melanocyte-stimulating hormone</i> (Hormônio estimulador dos melanócitos)
NAHRS	<i>North American Hair Research Society</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (Fator de crescimento neural)
NK-1	<i>Neurokinin-1</i> (neurocinina 1)
PGP 9.5	<i>Protein gene product 9.5</i> (produto genético proteico 9.5)
PhD	<i>Doctor of Philosophy</i> (Doutor / Doutora)
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator activator receptor-gamma</i> (receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo)
TGF	<i>Tumor growth factor</i> (Fator de crescimento tumoral)

TNF	<i>Tumor necrosis fator</i> (Fator de necrose tumoral)
UMN	Universidade de Minnesota
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia da unidade pilossebácea.....	02
Figura 2 - Folículo piloso e sua ampla rede de ligações.....	08
Figura 3 - Folículo piloso e sua relação com vasos e nervos.....	10
Figura 4 - Imagens clínicas de um paciente com LPP.....	29
Figura 5 - Imagens clínicas de um paciente com LPP.....	30
Figura 6 - Imagens clínicas de um paciente com AFF.....	31
Figura 7 - Imagens clínicas de um paciente com LPP.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da faixa etária e duração da doença nos pacientes com LPP e AFF.....24

Tabela 2 - Análise histopatológica da intensidade dos achados inflamatórios nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP27

Tabela 3 - Análise histopatológica da intensidade dos achados inflamatórios nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com AFF28

Tabela 4 - Análise da concentração de SP nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP e AFF.....36

Tabela 5 - Análise da concentração de CGRP nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP e AFF.....36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Análise dos dados demográficos e achados clínicos dos pacientes com LPP.....	25
Quadro 2 - Análise dos dados demográficos e achados clínicos dos pacientes com AFF.....	26
Quadro 3 - Resultados da IFD nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP.....	33
Quadro 4 - Resultados da IFD nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com AFF.....	34

Resumo

Soares IID. *Estudo da substância P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina em amostras do couro cabeludo e séricas de pacientes com líquen plano pilar e alopecia frontal fibrosante* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: Líquen plano pilar (LPP) e alopecia frontal fibrosante (AFF) são alopecias cicatriciais linfocíticas crônicas, caracterizadas pela destruição permanente da unidade pilossebácea. Neuropeptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) têm sido implicados no metabolismo lipídico das glândulas sebáceas e na manutenção do estado inflamatório de diversas doenças. **OBJETIVOS:** 1. Quantificar e comparar a expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP em amostras do couro cabeludo (áreas afetadas e aparentemente não afetadas) e séricas de pacientes com LPP e AFF, em relação a indivíduos saudáveis, utilizando a técnica de ELISA. 2. Analisar áreas afetadas e aparentemente não afetadas de pacientes com LPP e AFF através da imunofluorescência direta (IFD). **MÉTODO:** 20 pacientes (10 com LPP e 10 com AFF) e 11 indivíduos saudáveis foram submetidos a biópsias com *punch* de 4mm do couro cabeludo e coleta de amostras sanguíneas. Pacientes foram submetidos a biópsias das áreas afetadas e aparentemente não afetadas do couro cabeludo, as quais foram pareadas com amostras da região anterior e posterior do couro cabeludo dos indivíduos-controle. As amostras dos pacientes foram enviadas para análise histopatológica, IFD e teste de ELISA para SP e CGRP. As amostras dos controles foram submetidas à análise histopatológica e aos mesmos testes de ELISA. Sintomas (dor, prurido, queimação e formigamento) e sinais inflamatórios (eritema difuso, eritema peripilar e descamação peripilar) na região afetada dos pacientes também foram avaliados. Este estudo foi realizado nas Universidades de São Paulo (BRA) e de Minnesota (EUA), entre os anos de 2012 e 2014. **RESULTADOS:** A análise histopatológica evidenciou infiltrado perifolicular linfocítico típico em 70% das áreas aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF, além de fibrose e depósitos de mucina perifoliculares. Em relação à IFD, o resultado se mostrou positivo em 50% das amostras das áreas afetadas e em 40% das áreas aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP, em comparação a 40% e 20% nos casos de AFF, respectivamente. No teste de ELISA, pacientes do grupo LPP com infiltrado histopatológico de moderado a intenso na área afetada, demonstraram maior expressão de SP na área afetada, em comparação àquela aparentemente não afetada ($P=0,046$). Já pacientes do grupo AFF com o mesmo grau histopatológico de inflamação, demonstraram maior expressão de SP na área

aparentemente não afetada, em comparação à área afetada ($P=0,050$). No teste de ELISA para CGRP, pacientes com LPP e inflamação histopatológica de leve a ausente na área afetada, tiveram maior expressão deste neuropeptídeo na área aparentemente não afetada, em comparação à área afetada ($P=0,048$). Por outro lado, pacientes com AFF que tinham o mesmo grau de inflamação histopatológica, a expressão deste neuropeptídeo foi favorecida na área afetada, em relação àquela aparentemente não afetada ($P=0,050$). Todas as amostras séricas dos pacientes e controles e do couro cabeludo dos indivíduos-controle tiveram resultados indetectáveis para SP e CGRP no teste de ELISA. Nenhuma relação entre sinais e sintomas inflamatórios e expressão de SP e CGRP no teste de ELISA foi vista.

CONCLUSÃO: O acometimento das áreas aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF ao exame histopatológico, sugere que ambas as doenças possam acometer de forma difusa esta região. Apesar da semelhança dos achados histopatológicos entre pacientes com LPP e AFF, resultados antagônicos dos neuropeptídeos encontrados no teste de ELISA apontam para mecanismos fisiopatogênicos distintos. A inflamação neurogênica poderia explicar a sintomatologia e contribuir para a patogênese destas doenças.

Descritores: neuropeptídeos; substância P; receptores de peptídeos relacionado com o gene da calcitonina; inflamação neurogênica; alopecia; ensaio de imunoadsorção enzimática.

Abstract

Soares IID. *Study of the neuropeptides substance P and calcitonin gene-related peptide in the scalp and serum samples from patients with lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

INTRODUCTION: Lichen planopilaris (LPP) and frontal fibrosing alopecia (FFA) are primary lymphocytic cicatricial alopecias characterized by permanent destruction of the pilosebaceous unit. Neuropeptides such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) are related to lipid metabolism in sebaceous glands and to the maintenance of many inflammatory chronic disorders. OBJECTIVES: 1. Quantify SP and CGRP expression in affected and in normal-appearing scalp areas and serum samples from patients with LPP and FFA, and compare to healthy controls using ELISA technique. 2. Compare affected and normal-appearing areas from patients with LPP and FFA, using direct immunofluoresce (DIF) technique. METHODS: Twenty patients (10 with LPP and 10 with FFA) and eleven healthy controls underwent 4mm-punch biopsies and blood extraction. Patients collected samples from affected and normal-appearing scalp areas, and controls collected from anterior and posterior scalp areas. Patients samples were sent to histopathologic examination, DIF and ELISA tests for SP and CGRP detection. Control samples were sent to histopathologic examination and to the same ELISA tests. Symptoms (pain, burning, itching and tingling) and signs of inflammation (diffuse erythema, perifollicular erythema and perifollicular scale) were also assessed. This study was done at the Universities of São Paulo (Brazil) and Minnesota (USA), between 2012 and 2014. RESULTS: Normal-appearing scalp areas from patients with LPP and FFA showed lymphocytic perifollicular typical inflammation in 70% of the cases, as well as perifollicular fibrosis and mucin deposits. DIF test was positive in 50% of the affected areas and in 40% of normal-appearing areas from patients with LPP, comparing to 40% and 20% in the FFA group, respectively. In SP ELISA test, affected areas from patients with LPP that had histopathologic moderate or intense infiltrate showed more expression of SP in the affected scalp, comparing to normal-appearing areas ($P=0,046$). However, affected areas from patients with FFA that showed the same degree of histopathologic infiltrate had higher expression of SP in normal-appearing scalp, comparing to affected scalp ($P=0.050$). In CGRP ELISA test, affected scalp from patients with LPP that had histopathologic mild or irrelevant infiltrate showed increased CGRP expression in normal-appearing scalp areas, comparing to affected scalp ($P=0,048$).

Although, affected areas with the same degree of histopathologic inflammation from patients with FFA had more CGRP, comparing to normal-appearing scalp ($P=0,050$). All serum samples and scalp samples from controls had undetectable results in SP and CGRP ELISA tests. No clinical relationship was found among symptoms, signs of inflammation, and neuropeptide expression. CONCLUSION: Normal-appearing scalp areas can show histopathologic inflammation suggesting that both LPP and FFA can be more generalized processes affecting the scalp. Although both diseases share similar histopathologic findings, the opposite results in the ELISA test point that these diseases may have diverse pathogenic mechanisms. Neurogenic inflammation possibly play an important role in the pathogenesis of both LPP and FFA and may explain the symptomatic scalp some patients refer.

Descriptors: neuropeptides; substance P; receptors, calcitonin gene-related peptide; neurogenic inflammation; alopecia; enzyme-linked immunosorbent assay.

Introdução

1. Introdução

Anatomia do folículo piloso

A formação do folículo piloso humano ocorre entre a 8^a e a 12^a semanas de gestação. A haste pilosa é uma complexa rede interligada de múltiplas células mesenquimais e epiteliais, englobando mais de 20 tipos celulares. O folículo piloso ou unidade pilossebácea é constituído por haste pilosa, glândula sebácea e músculo piloerector.

As estruturas do folículo piloso podem ser divididas em três partes. A primeira parte, também denominada infundíbulo, vai desde a epiderme até a inserção da glândula sebácea no canal piloso. A segunda porção ou istmo se localiza entre a inserção da glândula sebácea e o *bulge*, local de inserção do músculo piloerector. A porção inferior, considerada a zona cíclica ou transitória, estende-se desde o *bulge* até a base do folículo.

No *bulge*, é possível notar uma protuberância ou compartimento especializado, onde estão localizadas células-tronco foliculares de origem epidérmica e neuroectodérmica, além de células mesenquimais imaturas, como células de Langerhans e mastócitos. A região da base do folículo contém o bulbo piloso, onde estão a papila dérmica e melanócitos foliculares. Esta região do bulbo mantém íntima ligação com as células do *bulge* para a sinalização do crescimento e da atividade cíclica do pelo. (Figura 1)

Figura 1: Anatomia da unidade pilossebácea.

Trecho extraído de Blume-Peytavi U, Tosti A, Whiting D, Trüeb R. *Hair and Growth Disorders*, p. 5

Legenda: Células epiteliais formam camadas concêntricas internas e externas da bainha radicular que recobrem a haste pilosa, composta por medula, córtex e cutícula. A papila folicular, localizada na região do bulbo, contém células mesenquimais com alto potencial proliferativo e está em íntima ligação com vasos e nervos perifoliculares. *Adaptado de cienciasdocabelo.com.br*

Ciclo capilar

Tradicionalmente, três fases do ciclo capilar são reconhecidas: fase de crescimento (anágena), fase de regressão (catágena) e fase de repouso (telógena). As transformações cíclicas são controladas por alterações nas vias de sinalização entre células da papila dérmica e do *bulge*. Estas transformações envolvem a participação de citocinas, hormônios, neurotransmissores e seus receptores, fatores de transcrição e enzimas, que interagem entre si numa ampla rede orquestrada, envolvendo os sistemas endócrino, nervoso central e periférico.

Durante a fase anágena, ocorre crescimento da haste capilar e intensa atividade proliferativa em todas as células foliculares e principalmente, nas células da matriz queratinocítica do bulbo. A duração da fase anágena é geneticamente determinada e pode variar de 2 a 6 anos no couro cabeludo.

A fase catágena é caracterizada pela regressão e involução do folículo piloso, com diminuição da produção de pigmento e da atividade proliferativa celular. Ocorre maciça apoptose na porção inferior do folículo e a formação de um cordão fibroso que vai desde a papila até a derme superficial. A duração desta fase é 2 a 3 semanas.

Na fase telógena ou de repouso, o tamanho do folículo piloso é reduzido em metade do seu tamanho original, estendendo-se somente até a derme superficial. Nenhuma atividade proliferativa ocorre durante este período. O pelo pode permanecer nesta fase por até 3 meses e é chamado de *club hair*. A saída da haste capilar do folículo é chamada de fase exógena, evento específico durante o ciclo capilar ainda pouco compreendido, no qual fatores intrínsecos ocorrem na base da haste capilar culminando com a sua expulsão.

A fase quenógena, um novo fenômeno no ciclo capilar, compreende o breve período entre a saída da haste pilosa e o início da fase anágena, no qual o folículo permanece vazio. Esta fase tem particular importância na alopecia androgenética, visto que parece estar aumentada tanto em homens quanto em mulheres que sofrem da doença.¹

Classificação das alopecias

As alopecias cicatriciais (AC) representam um grupo complexo de distúrbios do couro cabeludo caracterizadas pela destruição permanente da unidade folicular.² Consequentemente, indivíduos afetados podem sofrer graus variáveis de desfiguração, com redução da autoestima e prejuízo do convívio social.

As ACs primárias incluem um amplo grupo de doenças inflamatórias do couro cabeludo, nas quais o folículo piloso é o alvo primário da destruição. Já nas ACs secundárias, o folículo piloso é destruído em consequência de um processo inflamatório não específico, como traumas ou tumores.

Segundo a última classificação proposta pelo NAHRS (*North American Hair Research Society*) em 2001, as ACs primárias são classificadas em 3 grupos, de acordo com a predominância das células inflamatórias perifoliculares encontradas ao exame histopatológico: linfocíticas, neutrofilicas e mistas.³ O grupo das alopecias linfocíticas inclui: lúpus cutâneo crônico, líquen plano pilar (LPP), pseudopelada de Brocq, alopecia cicatricial central centrífuga, alopecia mucinosa e queratose folicular espinulosa e decalvante. O grupo das alopecias neutrofilicas engloba as foliculites decalvante e dissecante/abscedante e o grupo misto, que inclui acne queloidiana da nuca, acne necrótica e dermatose pustular erosiva.

LPP é uma alopecia cicatricial crônica, caracterizada clinicamente por descamação e eritema perifoliculares, com consequente perda dos óstios foliculares. Mulheres de meia-idade são mais frequentemente acometidas e não há predileção racial da doença. Embora crianças sejam raramente acometidas pelo líquen plano (LP),⁴ mais de 9% desenvolveram esta forma folicular da doença,⁵⁻⁷ com importante envolvimento do couro cabeludo em uma série de casos.⁵

As lesões características do LPP no couro cabeludo podem ser placas únicas ou múltiplas que geralmente envolvem o vértex e as regiões parietais. A evolução da doença pode ser indolente ou lentamente progressiva e raramente acomete todo o couro cabeludo. Cabelos anágenos podem ser facilmente destacados das áreas com atividade inflamatória e lesões características de LP na pele, nas mucosas e nas unhas podem estar associadas em até 50% dos pacientes.⁸

Atualmente, dois subtipos de LPP são reconhecidos: alopecia frontal fibrosante (AFF) e síndrome de *Graham-Little-Piccardi-Lassueur*. AFF, variante mais recentemente descrita, afeta na maior parte mulheres brancas menopausadas.^{9,10} Caracteriza-se mais comumente, por alopecia cicatricial progressiva em banda da região frontotemporal. Alopecia de supercílios costuma estar presente na maior parte dos pacientes e em caso de manifestação inicial, pode indicar formas mais brandas da doença.¹¹

Mais recentemente, a associação da AFF com pápulas fibrosas¹² e líquen plano pigmentoso da face foi descrita, sendo este último mais frequente em pacientes com fototipos altos.¹³ Já a variante *Graham-Little*, caracteriza-se por alopecia cicatricial progressiva do couro cabeludo, alopecia não cicatricial das regiões axilar e púbica e ceratose pilar difusa no tronco e nas extremidades.¹⁴

Pacientes afetados pelo LPP e suas variantes comumente referem sintomas sensoriais importantes como dor, queimação, prurido e parestesia nas áreas do couro cabeludo inervadas pelo nervo trigêmeo.¹⁵ O diagnóstico diferencial com outras formas de ACs pode ser feito através da avaliação clínica e dos achados imunoistopatológicos específicos. As opções terapêuticas dependem do grau de atividade e da extensão da doença.

LPPAI: Lichen Planopilaris Activity Index scoring system

Diante da dificuldade de avaliação e quantificação dos sinais inflamatórios da doença e dos sintomas referidos pelos pacientes, Chiang *et al*¹⁶ propuseram em 2010 a utilização de um escore numérico, o LPPAI. Este índice permitiu quantificar e comparar de forma mais objetiva tais sinais e sintomas no decorrer das intervenções terapêuticas.

A avaliação do índice inclui variáveis clínicas (eritema difuso, eritema peripilar e descamação peripilar), sintomas (prurido, dor e queimação), medida da atividade da doença (tração positiva de fio anágeno) e progressão da doença. Para cada sinal e sintoma é dada uma pontuação de 0 (ausente) a 3 (intensa). Em caso de tração positiva para fios anágenos, a pontuação é 1 e se negativa, 0. Para progressão da doença, a pontuação varia entre 0 (ausente), 1 (indeterminada) ou 2 (presente). Ao final, é feito um cálculo entre as variáveis que permite o valor final entre 0 e 10.

$$\text{LPPAI (0-10)} = (\text{somatória dos sinais e sintomas})/3 + 2,5 (\text{teste de tração}) + 1,5 (\text{progressão})/2$$

LPP: etiologia e patogênese

Apesar da etiologia e patogênese do LPP ser pouco compreendida, a teoria autoimune é a mais atualmente aceita, na qual linfócitos T ativados seriam dirigidos contra antígenos foliculares específicos.^{17,18} A imunidade celular desempenha papel importante na patogenia do LPP, visto que a maior parte dos linfócitos T ativados se concentra ao redor da região do *bulge*,¹⁹ porção do folículo próxima à inserção do músculo piloerector e onde as células-tronco foliculares estão localizadas.²⁰ Tais linfócitos T parecem ser ativados por células de Langerhans, as quais se mostraram aumentadas em lesões ativas do LPP, evidenciando assim, um possível papel do *bulge* na patogênese das alopecias cicatriciais primárias.²¹

Células-tronco foliculares são responsáveis pela renovação da parte superior do aparato folicular e das glândulas sebáceas, além de estarem relacionadas à fase anágena do ciclo de crescimento folicular.²⁰ Estudos sugerem que células-tronco foliculares, e não epidérmicas, sejam destruídas nas ACs, no entanto, se estas células seriam alvo primário ou epifenômeno do processo inflamatório ainda pouco se sabe.²²

Em cabelos anágenos normais, macrófagos estão geralmente ausentes no epitélio folicular. No entanto, em circunstâncias patológicas específicas, a destruição dos folículos poderia ser decorrente de um processo inflamatório macrofágico direcionado às células-tronco do epitélio folicular, estas últimas presentes na área do *bulge*.¹⁹

Estudos recentes demonstraram que o folículo piloso parece apresentar um certo “privilegio imune” nas células do bulbo com MHC (molécula de histocompatibilidade) classe Ia negativo, além de estar envolto por diversas citocinas imunossupressoras, como MSH (hormônio estimulador de melanócitos)- α e TGF (fator de crescimento tumoral)- β 1. Este privilégio imune serviria para proteger o folículo anágeno do reconhecimento de autoantígenos gerados durante o ciclo capilar e o processo de melanogênese, por células T CD8 auto-reativas.¹⁹

Achados imunoistoquímicos de biópsias de couro cabeludo de pacientes acometidos por LPP demonstraram aumento das células CD8 em relação a células CD4, além da maior expressão de genes envolvidos na ativação macrófágica, apoptose e remodelamento tecidual, em comparação a indivíduos saudáveis.²³

Da mesma forma, resultados da imunofluorescência direta evidenciaram depósitos globulares de IgM ou IgA na epiderme e na zona da membrana basal do folículo acometido pelo LPP. No entanto, estes achados costumam ser negativos ou ausentes nos pacientes com AFF.²⁴⁻²⁶

Papel do metabolismo lipídico nas alopecias cicatriciais

Recentemente, um novo modelo de patogênese para as ACs envolvendo metabolismo lipídico foi proposto.²⁷ PPAR- γ (receptor-gama ativado pelo proliferador de peroxissomo) é um fator de transcrição genético relacionado à regulação da inflamação e do metabolismo lipídico. A perda da função deste receptor levaria à diminuição na biogênese dos peroxissomos, organelas semelhantes aos lisossomos, responsáveis pela eliminação celular de determinados resíduos tóxicos. Assim, alterações na homeostase lipídica determinariam danos teciduais na unidade pilossebácea, com consequente ativação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de linfócitos.²⁷

Por outro lado, medicamentos agonistas do PPAR- γ , tais como rosiglitazona e pioglitazone, falharam em controlar a progressão da doença, sugerindo assim, que outros mecanismos na patogênese do LPP, como por exemplo, a influência de uma rede neuro-imune-hormonal, bem como o dano irreversível do privilégio immune follicular.

Neuropeptídeos e o sistema imune cutâneo

Descobertas recentes acerca dos neuropeptídeos trouxeram novas perspectivas para o papel dos nervos periféricos na pele. Um novo conceito de neurobiologia cutânea foi estabelecido, no qual o sistema nervoso central e periférico, os sistemas imune e endócrino e quase todas as células do organismo manteriam interações de forma mono e bidirecional.

Os sistemas imune cutâneo e neuroendócrino estão intimamente relacionados em diversos níveis de funcionamento em uma complexa rede de interações, envolvendo neuropeptídeos, suas enzimas degradantes, além de outros mediadores inflamatórios.

Nervos cutâneos, células imunes e a própria pele liberam neuropeptídios, neuromediadores necessários para o equilíbrio das respostas imunes e funções de reparo tecidual. Além de iniciarem a resposta imune do hospedeiro, os neuropeptídeos são importantes também para a regulação dos processos pró-inflamatórios cutâneos, como vasodilatação e migração de células de defesa na pele.²⁹

A interação entre os sistemas imune e nervoso ocorre tanto a nível local - através da inflamação neurogênica (inflamação causada por neuropeptídeos) e ativação imunológica, quanto central - através do controle dos padrões inflamatórios que incluem ativação de células linfomononucleares e secreção de citocinas linfocitárias. Consequentemente, um desequilíbrio no controle imune resultaria no desencadeamento de doenças e no desenvolvimento crônico de lesões.²⁹

A interação entre os nervos periféricos e o sistema imune é mediada por diferentes tipos de fibras cutâneas nervosas que liberam neuromediadores responsáveis pela ativação de receptores em estruturas específicas presentes na pele, como queratinócitos, mastócitos, células de Langerhans, células endoteliais e fibroblastos. (Figura 2)

Figura 2: Folículo piloso e sua ampla rede de ligações.

Legenda: *Langerhans cells*: células de Langerhans; *Melanocyte*: melanócito; *Keratinocyte*: queratinócito; *Merkell cell*: célula de Merkel; *Blood vessel*: vaso sanguíneo; *Fibroblast*: fibroblasto; *Mast cell*: mastócito; *Nerve fiber*: fibra nervosa; *Schwann cell*: célula de Schwann, *Endocrinum*: sistema endócrino; *CNS*: sistema nervoso central. *Cortesia: Charité – Universidade de Berlim, Alemanha.*

Estas interações interferem em uma variedade de funções que incluem desenvolvimento, crescimento e diferenciação celulares, imunidade, vasorregulação, recrutamento de leucócitos, prurido e cicatrização. Do mesmo modo, em circunstâncias fisiológicas, diversos mecanismos levam ao término das respostas celulares a partir da liberação também de neuropeptídeos.²⁹

A partir de estudos clínicos e experimentais, certos neuropeptídeos, como a SP (Substância P) e o CGRP (Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) poderiam estar envolvidos em diversos processos no organismo, como transmissão dolorosa durante crises de cefaléia^{30,31}, desenvolvimento de alguns tumores,³²⁻³⁵ e também manutenção do estado inflamatório de algumas doenças, tais quais dermatite de contato alérgica,³⁶ dermatite atópica,³⁷⁻³⁹ psoríase,³⁹⁻⁴⁴ urticária crônica,⁴⁵ rosácea,⁴⁶ alopecia areata,⁴⁷⁻⁴⁹ e mais recentemente, líquen plano oral,^{50,51} reações liquenóides⁵¹ e queratose folicular espinulosa e decalvante.⁵²

Os folículos pilosos são inervados por plexos nervosos próximos à área do *bulge* e das células-tronco, compostos por fibras C não- mielinizadas contendo neuropeptídeos.^{53,54} (Figura 3) Fibras nervosas perifoliculares contêm neuropeptídeos como SP e CGRP, os quais estão associados com a resposta inflamatória neurogênica,⁵⁵ incluindo vasodilatação. Além disso, SP e CGRP liberados de nervos cutâneos após estímulos traumáticos são capazes de induzir a produção de IL-1- α e IL-8; além de influenciarem a expressão de pró-NGF/NGF (fator de crescimento neural) e sua secreção pelos queratinócitos.⁵⁶

Figura 3: Folículo piloso e sua relação com vasos e nervos.

Legenda: Imunohistoquímica com coloração de vasos (vermelho), nervos (verde) e CGRP (azul) em um folículo anágeno sadio (Microscopia confocal, 100x). *Cortesia: Marna Ericson, PhD. Universidade de Minnesota (EUA).*

SP, primeiramente isolada no cérebro e no intestino em 1931, é um peptídeo bioativo formado por 11 aminoácidos. Este peptídeo está envolvido em diversos processos fisiológicos, incluindo modulação dolorosa, contração muscular, função vasomotora, renal e de homeostase do organismo.⁵⁷⁻⁵⁹ A SP está vastamente distribuída nos tecidos e fluidos corpóreos, como sistema nervoso central e periférico, trato gastrointestinal e respiratório, sistema visual e circulatório.⁵⁹ A SP liberada por fibras delta C e A está associada com a degranulação de mastócitos na pele⁶⁰ e nos vasos da dura-máter.⁶¹ Na pele, a SP perifolicular está também envolvida na indução e regulação do crescimento capilar.⁶⁰

O CGRP é composto por 37 aminoácidos e é um dos neuropeptídeos mais abundantes no corpo humano. Está amplamente distribuído nos sistemas nervoso central e periférico e nas fibras nervosas perifoliculares. Os efeitos do CGRP no organismo ocorrem mediante interação com o seu receptor, também encontrado nos folículos pilosos.⁶²

Atualmente, sabe-se que o CGRP possui tanto funções estimulatórias quanto inibitórias no crescimento capilar, interagindo de forma orquestrada com a SP na manutenção do ciclo capilar. Mais recentemente, sua participação na melanogênese juntamente com a SP e os queratinócitos também foi relatada.^{63,64}

Estudos pilotos realizados na Universidade de Minnesota (UMN) - EUA demonstraram aumento do número de mastócitos perifoliculares nos pacientes com LPP e alopecia areata (AA), em comparação a indivíduos saudáveis. No entanto, o aumento da degranulação mastocitária não seria suficiente para justificar a sintomatologia nos pacientes acometidos pelo LPP, visto que pacientes com o diagnóstico de AA são geralmente assintomáticos. (dados não publicados)

Estudos na mesma universidade utilizando técnicas de imunoistoquímica e microscopia confocal demonstraram diminuição da densidade de fibras nervosas do couro cabeludo de pacientes acometidos por LPP, em comparação a indivíduos saudáveis ($P < 0,01$). Além disso, fibras nervosas coradas pelo CGRP estavam diminuídas ($P = 0,06$), enquanto fibras nervosas coradas pela SP estavam aumentadas nestes pacientes ($P = 0,62$), em comparação aos controles.⁽¹⁾

Em 2011, foram realizados os primeiros testes para a detecção de neuropeptídeos em amostras de pele utilizando a técnica ELISA (Ensaio Imunoenzimático) na UMN. Houve aumento da expressão de SP nas amostras da área afetada de um indivíduo sintomático com LPP (113 pg SP/mg de tecido), em comparação com controles saudáveis (51,3 e 88,2 pg SP/mg de tecido). Os kits foram validados utilizando amostras de polpas dentárias (dados não publicados).⁽¹⁾

Estimulados pela possível participação dos neuropeptídeos na fisiopatologia das ACs e nos achados prévios de estudos pilotos realizados na UMN, decidimos quantificar a expressão da SP e do CGRP em áreas afetadas e aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF, a fim de melhor elucidar seus mecanismos relacionados.

(1) Doche I, Hordinsky M. Forum session. (Apresentação oral no 73rd American Academy Dermatology Annual Meeting; 2015; EUA).

A terapêutica atual das ACs geralmente é muito desafiadora, visto que as doenças costumam ser resistentes ao tratamento e as crises, altamente recidivantes. Futuramente, intervenções nos mecanismos de sinalização dos neuropeptídeos poderão abrir novas perspectivas para o tratamento não só das alopecias cicatriciais, como LPP e AFF, mas também de outras desordens com participação da inflamação neurogênica.²⁹ Este trabalho foi realizado no Ambulatório de Tricologia do Hospital das Clínicas da FMUSP em colaboração com os Departamentos de Dermatologia e Neurociência da UMN, entre os anos de 2009 e 2014.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Gerais

Quantificar e comparar a expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP em amostras séricas e das áreas afetadas e aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF, através da técnica de ELISA.

2.2 Específicos

- (1) Correlacionar a expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP no teste de ELISA com sinais e sintomas inflamatórios, tempo de doença e variantes clínicas.
- (2) Avaliar as alterações histopatológicas das amostras das áreas afetadas e aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF e de indivíduos-controle.
- (3) Avaliar os achados da imunofluorescência direta (IFD) das áreas afetadas e aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF.
- (4) Avaliar a expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP em amostras séricas de pacientes com LPP e AFF e em indivíduos-controle, através da técnica de ELISA.
- (5) Estudar o papel da inflamação neurogênica na patogênese do LPP e da AFF.

Métodos

3. Métodos

3.1 Casuística

Foram incluídos 20 pacientes (10 com LPP e 10 com AFF), 17 mulheres e 3 homens, entre 34 e 84 anos e 11 controles sadios, todos do sexo feminino, entre 37 e 70 anos, atendidos no Ambulatório de Tricologia do Setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, entre os anos de 2012 e 2014. Dados clínicos como fototipo, duração da doença, lesões clínicas associadas, sinais inflamatórios e sintomas referidos pelos pacientes foram registrados. Amostras de indivíduos-controle pareados por sexo, idade e fototipo foram colhidas para comparação de resultados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (Anexo C) e de Minnesota. (Anexo D) Todos os participantes foram avaliados pelo mesmo pesquisador e foram incluídos no estudo após assinarem TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). (Anexos E e F)

3.1.1 Critérios de inclusão

- Paciente com quadro clínico clássico de LPP ou AFF e que apresente pelo menos um sinal de inflamação no couro cabeludo (eritema difuso, eritema peripilar, descamação peripilar) e/ou qualquer sintoma relacionado à inflamação (dor, prurido, queimação ou formigamento)
- Homens e mulheres com idade igual ou superior a 18 anos
- Pacientes dispostos a ficarem sem a utilização de produtos que promovam ou estimulem o crescimento ou fortalecimento capilar ou que interfiram no estado inflamatório da doença durante o período do estudo
- Pacientes ou responsáveis capazes de fornecerem consentimento informado
- Pacientes dispostos a aderir ao estudo, incluindo exame do couro cabeludo, realização de biópsias, exames sanguíneos e fotografias

O gênero dos pacientes não determinou a seleção dos mesmos. Não houve proporção específica homens/mulheres nem restrições raciais para o estudo.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Outros tipos associados de alopecia no local das biópsias
- Pacientes imunossuprimidos (história de transplantes, câncer, quimioterapia, esplenectomia, infecção pelo HIV, tuberculose ativa)
- Doenças agudas ou crônicas, como diabetes, hipertensão, enxaqueca frequente, neuropatias, hiper ou hipotireoidismo não estabilizadas por menos pelo menos 6 meses
- Cefaléias constantes
- Aplicação de injeções ou produtos tópicos no couro cabeludo (exemplo: minoxidil, xampu ou loção antisseborreica, agentes imunomoduladores ou imunossupressores) nas últimas 6 semanas
- Uso oral de medicações anti-inflamatórias, como ácido acetilsalicílico, dipirona, paracetamol ou outro analgésico nos últimos 7 dias
- Uso oral de antibióticos ou medicações antialérgicas nas últimas 8 semanas
- Administração sistêmica de corticosteróides ou outro tratamento sistêmico que tenha ação imunomoduladora ou imunossupressora nas últimas 8 semanas
- Uso de cloroquina ou seus derivados nas últimas 8 semanas
- Exposição solar excessiva nas últimas 48 horas
- Evidência clínica de infecções secundárias no couro cabeludo
- Outras doenças inflamatórias ou infecciosas da pele
- Uso de medicações de caráter investigativo nos últimos 30 dias
- Pacientes com tendência a formação de quelóides
- Histórico de alergias graves a lidocaína.

3.2 Coleta das amostras

Pacientes qualificados para o estudo completaram todos os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão. Aqueles qualificados foram submetidos a cuidadoso exame do couro cabeludo para determinar o tipo clínico e a extensão das lesões. Fotografias das áreas

afetadas e dos locais das biópsias foram registradas. Lesões compatíveis com LP em outros locais como unhas, mucosas ou pele foram registradas.

Cinco biópsias com *punch* de 4mm foram realizadas no couro cabeludo de cada paciente, sendo três lado-a-lado da área mais afetada, isto é, com mais sinais inflamatórios. Destas, duas foram enviadas para histopatologia (sendo uma para corte horizontal, e a outra dividida ao meio para corte vertical e IFD) e uma amostra, para o teste de ELISA. Da área aparentemente não afetada foram colhidas duas amostras, sendo uma seccionada ao meio para corte vertical da histopatologia e para IFD e a outra, para o teste de ELISA. Todas as amostras das áreas afetadas foram provenientes da região anterior do couro cabeludo e aquelas das áreas aparentemente não afetadas, da área posterior ou occipital.

Indivíduos controles foram submetidos a quatro biópsias com *punch* de 4mm nos locais correspondentes às amostras dos pacientes, sendo duas da área anterior e duas da área posterior do couro cabeludo. De cada área, um fragmento foi destinado para o teste de ELISA e outro para histopatologia, corte horizontal. Foram obtidas amostras sanguíneas de todos os participantes do estudo.

3.2.1 Preparo do exame histopatológico

Após a seleção dos pacientes e indivíduos-controle, foram realizadas biópsias com *punch* de 4 mm em cada indivíduo, sob anestesia local com lidocaína a 1%, e posteriormente, o local foi suturado com fio mononylon 4-0. As biópsias enviadas para análise histopatológica foram armazenadas em formol e processadas segundo técnicas de rotina para inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram microtomizados com espessura de 3 μ e corados por hematoxilina-eosina (HE). A intensidade do infiltrado inflamatório perifolicular linfocítico na região istmo-infundibular das amostras foi graduada em 0 (ausente ou irrelevante), 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (intensa). A graduação do infiltrado foi feita pelo mesmo dermatopatologista, cego ao estudo, através da análise comparativa subjetiva entre as amostras.

3.2.2 Preparo da técnica de IFD

As amostras coletadas dos pacientes foram acondicionadas em *Meio de Michel* até a sua preparação. Após serem retirados do meio de coleta, os tecidos foram lavados duas vezes por 15 minutos cada, em agitador orbital, trocando-se o meio entre cada lavagem. Posteriormente, as amostras foram armazenadas com crioprotetor (*Tissue-Tek®*) em freezer a -20°C. Em criostato a -20°C, os fragmentos de pele foram cortados a 4µ e aderidos em lâmina silanizada (3 cortes por lâmina).

Para a reação, os cortes receberam o conjugado (anti-imunoglobulina humana produzida em animal imunizado e associada a um fluorocromo = conjugado FITC - fluoresceína isocianetada) diluído em Azul de Evans. Os conjugados utilizados foram: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM e anti-C3 (todos adquiridos comercialmente, marca *Sigma-Aldrich Company, St Louis, MO, EUA* ou *Dako, Agilent Technologies Company, Glostrup, Copenhagen, Denmark*). Os cortes permaneceram com o conjugado por 30 minutos, em câmara úmida sob temperatura ambiente e protegidos da luz, para ligação ao imunocomplexo.

A seguir, as lâminas foram lavadas em TBS (tampão Tris base com cloreto de cálcio) pH 7,5 por dois períodos de 10 minutos cada ou um período de 20 minutos. Para a montagem das lâminas, utilizou-se glicerina tamponada (pH 8,5) e lamínula de vidro. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência HBO 50w (filtro CB12) marca *Carl Zeiss*, com oculares de 10x e objetivas de 16x e 40x. O resultado foi dado em padrão e localização da fluorescência.

3.2.3 Preparo e processamento das amostras para a técnica de ELISA

Todas as amostras sanguíneas foram centrifugadas e o soro obtido foi congelado em freezer a -80°C para posterior envio à Universidade de Minnesota. Todas as amostras de pele foram coletadas em tubo seco e mantidas resfriadas com gelo até armazenamento no freezer a -80°C. Todas as amostras foram posteriormente enviadas em gelo seco para o

Laboratório de Neurociências da Universidade de Minnesota, onde foi feito o preparo do material colhido para a técnica do ELISA e sua posterior análise.

Etapas:

- Descongelamento das amostras em temperatura ambiente
- Pesagem das amostras após colocação das mesmas em tubos secos previamente pesados e centrifugados
- Remoção dos pelos das amostras
- Corte dos tecidos em pequenos pedaços
- Homogeneização das amostras com triturador
- Adição de 1ml da solução tampão correspondente a cada kit em cada tubo
- Lise celular através de ultrassonificação das amostras
- Centrifugação das amostras por 25 minutos em máxima velocidade possível
- Remoção de 200µL de sobrenadante
- Congelamento do sobrenadante em freezer a -80°C durante a noite
- Início da técnica padronizada do ELISA, de acordo com o protocolo padrão contido nos kits utilizados (Anexo – outros)

3.2.4 Preparo da técnica de ELISA

Para determinar a presença de SP e CGRP na suspensão de couro cabeludo foi realizado um ensaio de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (*Cayman Chemical Company*, Ann Arbor, MI, EUA) e protocolos validados pela *Societ de Pharmacologie ET d'Immunologie* – BIO (SPI-BIO).

Resumidamente, foram utilizadas microplacas de 96 orifcios pr-sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-CGRP ou anti-SP. Os orifcios foram lavados 5 vezes com soluo tampo de lavagem e incubados com 100 µL de diluies da curva padro (concentraes padres de 500 - 3.9 pg/mL para SP e 1000 - 7.81 pg/mL para CGRP) e 100 µL das amostras puras a serem testadas por 16-20 horas a 4°C.

Posteriormente, os orifcios foram lavados 3 vezes com soluo de lavagem do kit (300µl/orifcio), sendo 2 minutos cada lavagem. Os orifcios foram ento incubados com 200

μL do reagente de detecção (reagente Ellman's do kit) por aproximadamente por 90-120 minutos para SP e 30-60 minutos para CGRP a temperatura ambiente. A leitura do teste para SP foi feita após 210 minutos e para CGRP, após 90 minutos em Leitor de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 405-415 nm.

3.3 Análise estatística

Foram calculados a média e o desvio-padrão das variáveis demográficas, como idade e tempo de doença, em cada grupo de doença. A comparação entre os grupos LPP e AFF foi realizada através de teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, após verificação da existência ou não de distribuição normal dos valores obtidos.

Os resultados dos neuropeptídeos SP e CGRP, obtidos através da técnica de ELISA, foram avaliados por meio de teste estatístico não-paramétrico de Wilcoxon, o qual verificou se a quantidade encontrada na área afetada e aparentemente não-afetada de cada paciente foi estatisticamente diferente nos dois locais do couro cabeludo para cada grupo de doença.

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa de estatística "*SPSS Statistics*" versão 19.0 (IBM®, USA). O nível de significância considerado foi de 5% ($P \leq 0,050$).

Resultados

4. Resultados

4.1 Dados demográficos e apresentação clínica dos pacientes

Dos 20 pacientes selecionados, 10 (50%) tinham o diagnóstico de LPP e 10 (50%) de AFF, nas suas formas típicas. Do total, 17 pacientes (85%) eram do sexo feminino e 3 (15%) do sexo masculino, sendo 8 (80%) mulheres e 2 (20%) homens no grupo LPP e 9 (90%) mulheres e 1 (10%) homem no grupo AFF.

Pacientes de todos os fototipos, segundo a escala de Fitzpatrick (Anexo B), foram incluídos no estudo, com a seguinte distribuição: tipo I (n=2 com LPP e n=1 com AFF), tipo II (n=0 com LPP e n=2 com AFF), tipo III (n=2 com LPP e n=5 com AFF), tipo IV (n=1 com LPP e n=2 com AFF), tipo V (n=2 com LPP e n=0 com AFF) e tipo VI (n=3 com LPP e n=0 com AFF).

Não houve diferença estatística em relação à média de idade em ambas as doenças: 58,5 anos no grupo com LPP e 54,5 anos no grupo com AFF ($P=0,650$) (Tabela 1). A média da duração da doença também foi similar para as doenças: 24 meses para o grupo com LPP e 18 meses para o grupo com AFF ($P=0,617$). (Tabela 1)

Dos pacientes com LPP, somente 3 (30%) apresentaram outras lesões associadas. Os achados clínicos encontrados foram: alopecia pubiana (20%), alopecia axilar (10%), líquen plano cutâneo (10%) e líquen plano ungueal (10%). (Quadro 1) Já em relação aos pacientes com AFF, 6 (60%) apresentaram lesões extra-couro cabeludo, como alopecia de supercílio (50%), pápulas faciais (30%), líquen plano pigmentoso (10%) e alopecia dos pelos dos membros (20%). (Quadro 2)

Foram selecionados 11 indivíduos-controle, com idades entre 37 e 70 anos, todos mulheres e distribuídos da seguinte maneira na escala de fototipo de Fitzpatrick: tipo I (n=0), tipo II (n=2), tipo III (n=3), tipo IV (n=3), tipo V (n=3) e tipo VI (n=0). Todos eram provenientes do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Tabela 1 – Análise da faixa etária e da duração da doença nos pacientes com LPP e AFF.

LPP					AFF				
	n	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	n	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	P
Idade (anos)	10	41,75	58,50	65,75	10	51,00	54,50	57,00	0,650
Doença (meses)	10	10,25	24,00	60,00	10	10,50	18,00	39,00	0,617

Legenda: LPP – líquen plano pilar, AFF – alopecia frontal fibrosante. Teste de Mann-Whitney ($P \leq 0,050$).

4.2 Sintomas e sinais inflamatórios ao exame físico

Sinais inflamatórios presentes na área afetada, como eritema difuso, eritema peripilar e descamação peripilar foram avaliados e graduados de 0 (ausente) a 3 (intenso). Sintomas presentes no local mais afetado, como dor, prurido, queimação e formigamento foram avaliados, segundo a opinião do paciente, e variaram de 0 (ausente) a 5 (muito intenso). (Quadros 2 e 3)

A análise dos sinais inflamatórios foi baseada no LPPAI (*Lichen Planopilaris Activity Index scoring system*)¹⁶ e realizada pelo mesmo pesquisador. O achado clínico mais frequente foi a descamação peripilar (80% em ambos os grupos) e o sintoma mais frequente foi o prurido (40% no grupo AFF e 60% no grupo LPP). (Quadros 2 e 3) As áreas aparentemente não afetadas dos pacientes apresentaram descamação clínica não específica mínima ou ausente, compatível com a encontrada no couro cabeludo normal.

Quadro 1 – Análise dos dados demográficos e achados clínicos dos pacientes com LPP.

LPP

Paciente	Idade (anos)	Gênero	Fototipo	Doença (meses)	Lesões associadas	Sintomas (área afetada)				Sinais (área afetada)		
						D	P	Q	F	ED	EP	DP
1	34	M	V	12	-	0	0	0	0	0	1	2
2	38	F	VI	36	alopecia pubiana e axilar	4	5	1	5	1	2	2
3	43	F	III	360	líquen plano cutâneo, alopecia dos membros	0	0	0	0	0	1	0
4	46	M	IV	3	líquen plano ungueal	0	3	3	0	1	0	3
5	55	F	VI	5	-	0	3	0	3	0	1	1
6	62	F	V	3	-	0	0	0	0	0	0	3
7	62	F	III	60	-	0	0	0	0	0	0	2
8	65	F	I	36	-	0	0	0	0	0	0	2
9	69	F	VI	12	-	0	0	0	0	0	0	1
10	84	F	I	60	-	0	5	0	0	0	1	0

Legenda: LPP – líquen plano pilar, M – masculino, F - feminino, D – dor, P – prurido, Q – queimação, F – formigamento, ED – eritema difuso, EP – eritema peripilar, DP – descamação peripilar. Intensidade dos sintomas: de 0 (ausente) a 5 (muito intenso). Intensidade dos sinais: de 0 (ausente) a 3 (intenso).

Quadro 2 – Análise dos dados demográficos e achados clínicos dos pacientes com AFF.

AFF

Paciente	Idade (anos)	Gênero	Fototipo	Doença (meses)	Lesões associadas	Sintomas (área afetada)				Sinais (área afetada)		
						D	P	Q	F	ED	EP	DP
1	46	F	III	48	líquen plano pigmentoso, pápulas faciais	0	3	0	0	0	1	0
2	48	F	III	12	alopecia de supercílios	0	3	0	2	0	1	1
3	52	F	IV	24	-	5	5	5	5	0	1	1
4	53	F	III	24	alopecia de supercílios, pápulas faciais	0	0	0	0	0	0	1
5	54	F	III	12	alopecia de supercílios	0	2	0	0	0	0	2
6	55	F	II	12	-	0	0	0	0	0	0	0
7	56	F	IV	2	alopecia de supercílios e dos membros	0	0	0	0	0	0	1
8	57	M	I	6	-	0	0	0	0	0	1	1
9	57	F	III	36	alopecia de supercílios e dos membros, pápulas faciais	0	3	0	0	1	2	2
10	60	F	II	60	-	0	3	2	2	1	1	2

Legenda: AFF – alopecia frontal fibrosante, M – masculino, F - feminino, D – dor, P – prurido, Q – queimação, F – formigamento, ED – eritema difuso, EP – eritema peripilar, DP – descamação peripilar. Intensidade dos sintomas: de 0 (ausente) a 5 (muito intenso). Intensidade dos sinais: de 0 (ausente) a 3 (intenso).

4.3 Exame histopatológico

Áreas afetadas e aparentemente não afetadas de todos os pacientes foram avaliadas para achados histopatológicos sugestivos de LPP ou AFF, como infiltrado inflamatório perifolicular linfocítico ao redor da região istmo-infundibular e fibrose perifolicular lamelar concêntrica. A intensidade do infiltrado encontrado em cada amostra foi graduada em: 0 (ausente ou irrelevante), 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (intensa), de acordo com a avaliação subjetiva do patologista e da comparação cega entre as amostras. (Tabelas 2 e 3) Nenhuma relação clínica foi vista entre sinais, sintomas inflamatórios e intensidade do infiltrado no exame histopatológico. (Figuras 4 a 7)

Áreas afetadas de pacientes com LPP demonstraram fibrose perifolicular em 60% dos casos e depósitos de mucina em 30% dos casos, enquanto áreas aparentemente não afetadas demonstraram 20% e 10%, respectivamente. No grupo AFF, amostras da área afetada demonstraram fibrose perifolicular concêntrica em 90% dos casos e depósitos de mucina em 50% delas, enquanto áreas aparentemente não afetadas demonstraram 20% e 10%, respectivamente.

Tabela 2 – Análise histopatológica da intensidade dos achados inflamatórios nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP.

LPP

Paciente	ÁREA AFETADA	ÁREA NÃO AFETADA
1	1	2
2	2	1
3	2	0
4	3	0
5	1	1
6	1	1
7	2	1
8	2	1
9	1	1
10	0	0

Legenda: LPP – líquen plano pilar. Intensidade da inflamação perifolicular foi graduada em 0 (ausente ou irrelevante), 1 (leve), 2 (moderada) ou 3 (intensa).

Tabela 3 – Análise histopatológica da intensidade dos achados inflamatórios nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com AFF.

AFF

Paciente	ÁREA AFETADA	ÁREA NÃO AFETADA
1	2	1
2	2	2
3	2	0
4	2	0
5	1	0
6	0	2
7	2	1
8	2	1
9	1	1
10	2	2

Legenda: AFF – alopecia frontal fibrosante. Intensidade da inflamação perifolicular foi graduada em 0 (ausente ou irrelevante), 1 (leve), 2 (moderada) ou 3 (intensa).

Figura 4 – Imagens clínicas e histopatológicas de um paciente com LPP.

ÁREA AFETADA

ÁREA NÃO AFETADA

Legenda: Caso 1 – Masculino, 34 anos, fototipo V, assintomático, há 1 ano com múltiplas placas cicatriciais no couro cabeludo, sugestivas de LPP (líquen plano pilar). A - Área afetada com placas cicatriciais não inflamatórias no vértex. B - Infiltrado inflamatório perifolicular linfocítico leve, mais precisamente ao redor da região istmo-infundibular. Notar fibrose perifolicular e mucina. HE (Hematoxilina-eosina), 100X. C - Área aparentemente não afetada com ausência de lesões visíveis ao exame clínico. D - Infiltrado inflamatório perifolicular moderado na região do istmo, associado à fibrose perifolicular e mucina. HE, 100 X.

Figura 5 – Imagens clínicas e histopatológicas de um paciente com LPP.

ÁREA AFETADA

ÁREA NÃO AFETADA

Legenda: Caso 4 – Masculino, 46 anos, fototipo IV, há 3 meses com múltiplas placas pruriginosas no couro cabeludo, sugestivas de LPP (líquen plano pilar). A - Área afetada com eritema difuso e descamação peripilar no vértex. B - Infiltrado inflamatório intenso perifolicular na região do infundíbulo e istmo, com fibrose perifolicular e mucina. HE, 100X C - Área aparentemente não afetada do couro cabeludo sem lesões clínicas aparentes. D - Infiltrado inflamatório ausente ou irrelevante. HE, 100X.

Figura 6 - Imagens clínicas e histopatológicas de uma paciente com AFF.

Legenda: Caso 2 – Feminino, 48 anos, fototipo III, há 1 ano com recessão frontotemporal cicatricial, sugestivas de AFF (alopecia frontal fibrosante), com prurido local. A - Área afetada com recessão da linha frontotemporal, sem sinais inflamatórios. B - Infiltrado perifolicular linfocítico moderado na região do istmo, com fibrose perifolicular e depósitos de mucina. HE, 100X. C - Área aparentemente não afetada sem lesões clínicas aparentes. D - Infiltrado inflamatório perifolicular linfocítico moderado. HE, 100X.

Figura 7 – Imagens clínicas e histopatológicas de uma paciente com AFF.

ÁREA AFETADA

ÁREA NÃO AFETADA

Legenda: Caso 6 – Feminino, 55 anos, fototipo III, assintomática, há 1 ano com recessão frontotemporal leve, sugestiva de AFF. A – Área afetada com rarefação leve da região frontal, sem sinais de inflamação. B – Infiltrado inflamatório ausente ou irrelevante. HE, 100X. C - Área aparentemente não afetada sem alterações aparentes. D – Infiltrado inflamatório perifollicular moderado na região do istmo e do infundíbulo. HE, 100X.

4.4 Imunofluorescência Direta

As amostras das áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes foram analisadas, segundo a fluorescência dos anticorpos anti-humanos primários conjugados à FITC (anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM e anti-C3).

Dos 20 pacientes estudados, somente 45% (n=9) mostraram resultados positivos nas áreas afetadas, sendo 50% (n=5) no grupo LPP e 40% (n=4) no grupo AFF. Já em relação às áreas aparentemente não afetadas, 30% das amostras foram positivas, sendo 40% (n=4) no grupo LPP e 20% (n=2) no grupo AFF. Em ambas as doenças, o anticorpo anti-IgM foi o mais prevalente. (Quadros 3 e 4)

Quadro 3 – Resultados da IFD nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP.

LPP

Paciente	AFETADA	NÃO AFETADA
1	IgM: granulosa, discreta, contínua na ZMB e na BRE	IgM: granulosa, discreta, contínua na ZMB e corpos citóides fluorescentes da derme papilar
2	Negativa	Negativa
3	IgA: corpos citóides na derme papilar IgM: homogênea, moderada, contínua na ZMB e corpos citóides da derme papilar	IgM: homogênea, moderada, contínua na ZMB IgG: homogênea, moderada, contínua na ZMB
4	Negativa	Negativa
5	IgM: granulosa, discreta, descontínua na ZMB	Negativa
6	Negativa	Negativa
7	IgM: granulosa, discreta, descontínua na ZMB	Negativa
8	IgG: núcleo dos queratinócitos da epiderme	C3: homogênea, focal, moderada na ZMB IgM: homogênea, focal, moderada na ZMB
9	Negativa	Negativa
10	Negativa	IgA: homogênea, discreta, descontínua na ZMB IgG: homogênea, descontínua, moderada na ZMB e ao redor dos anexos cutâneos

Legenda: IFD – imunofluorescência direta, LPP – líquen plano pilar, ZMB – zona da membrana basal, BRE – bainha radicular externa. Fluorescência para os anticorpos anti-humanos primários conjugados à fluoresceína FITC (anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM e anti-C3).

Quadro 4 – Resultados da IFD nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com AFF.

AFF

Paciente	AFETADA	NÃO AFETADA
1	Negativa	Negativa
2	Negativa	IgM: corpos citóides fluorescentes na derme papilar
3	C3: núcleo nos queratinócitos	Negativa
4	Negativa	Negativa
5	Negativa	Negativa
6	IgM: granulosa, contínua, moderada na ZMB e ao redor dos anexos cutâneos	Negativa
7	C3: núcleo dos queratinócitos da epiderme IgM: granulosa, discreta, contínua na ZMB	Negativa
8	Negativa	Negativa
9	Negativa	Negativa
10	IgM: granulosa, discreta, descontínua na ZMB e raros corpos citóides na derme papilar	IgM: granulosa, discreta, descontínua na ZMB e raros corpos citóides na derme papilar

Legenda: IFD – imunofluorescência direta, AFF – alopecia frontal fibrosante, ZMB – zona da membrana basal. Fluorescência para os anticorpos anti-humanos primários conjugados à fluoresceína FITC (anti-IgA, anti IgG, anti IgM e anti-C3).

4.5 Técnica de ELISA – neuropeptídeos nas amostras do couro cabeludo

Para a análise dos resultados do teste de ELISA, as amostras das áreas afetadas dos pacientes foram separadas em dois grupos para cada doença. Esta divisão foi baseada no critério da presença de maior ou menor inflamação nesta região ao exame histopatológico em: inflamação <2 (0 irrelevante ou 1 leve) e inflamação ≥ 2 (2 moderada ou 3 intensa).

Em relação ao teste de ELISA para SP, áreas afetadas de pacientes do grupo LPP que tinham inflamação moderada ou intensa (≥2) ao exame histopatológico, apresentaram maior quantidade do neuropeptídeo nestas áreas, em comparação às

áreas aparentemente não afetadas ($P=0,046$). Já áreas afetadas de pacientes com AFF que apresentavam a mesma intensidade de inflamação ao exame histopatológico, mostraram maior quantidade deste neuropeptídeo nas áreas aparentemente não afetadas, quando comparado às áreas afetadas ($P=0,050$). (Tabela 4)

Em relação ao teste de ELISA para SP, áreas afetadas de pacientes do grupo LPP que tinham inflamação moderada ou intensa (≥ 2) ao exame histopatológico, apresentaram maior quantidade do neuropeptídeo nestas áreas, em comparação às áreas aparentemente não afetadas ($P=0,046$). Já áreas afetadas de pacientes com AFF que apresentavam a mesma intensidade de inflamação ao exame histopatológico, mostraram maior quantidade deste neuropeptídeo nas áreas aparentemente não afetadas, quando comparado às áreas afetadas ($P=0,050$). (Tabela 4)

Em relação ao teste de ELISA para CGRP, áreas afetadas de pacientes com LPP que tinham inflamação leve ou irrelevante (< 2) ao exame histopatológico, mostraram maior concentração deste neuropeptídeo nas áreas aparentemente não afetadas, em relação às áreas afetadas ($P=0,048$). No entanto, áreas afetadas de pacientes com AFF que exibiam o mesmo grau de inflamação ao exame histopatológico, demonstraram maior expressão de CGRP nestas áreas, em comparação às áreas aparentemente não afetadas ($P=0,050$). (Tabela 5)

Os valores encontrados no teste de ELISA para ambos os neuropeptídeos no grupo de pacientes com LPP e AFF ficaram levemente abaixo da curva padrão dos testes, portanto abaixo dos valores de detecção dos kits utilizados. O grupo controle mostrou resultados indetectáveis de SP e CGRP no teste de ELISA em ambas as amostras da região anterior e posterior do couro cabeludo. Não foi possível encontrar associação clínica entre sinais, sintomas referidos pelos pacientes, intensidade da inflamação na histopatologia e expressão de neuropeptídeos no teste de ELISA.

Tabela 4 – Análise da concentração de SP nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP e AFF.

Doença	Inflamação	n	AFETADA			n	NÃO AFETADA			P
	(área afetada)		1º Quartil	Mediana	3º Quartil		1º Quartil	Mediana	3º Quartil	
LPP	≥2	5	7,88	11,69	21,44	5	5,13	9,40	10,66	0,046
LPP	<2	5	7,82	9,21	15,21	5	6,27	10,43	23,25	0,465
AFF	≥2	6	5,75	5,75	20,67	6	7,79	9,30	21,51	0,050
AFF	<2	4	4,87	7,69	17,30	4	4,36	8,20	18,61	0,686

Legenda: SP – substância P, LPP – líquen plano pilar, AFF – alopecia frontal fibrosante. Teste de Wilcoxon ($P \leq 0,050$) Inflamação ≥ 2 : infiltrado linfocítico perifolicular moderado ou intenso na área afetada dos pacientes ao exame histopatológico. Inflamação <2: infiltrado linfocítico perifolicular leve ou irrelevante na área afetada dos pacientes ao exame histopatológico. Valores em pg/4mm.

Nota: Para o cálculo desta tabela, somente foi considerada a intensidade da inflamação nas áreas afetadas dos pacientes, devido ao pequeno número de participantes no estudo.

Tabela 5 – Análise da concentração de CGRP nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP e AFF.

Doença	Inflamação	n	AFETADA			n	NÃO AFETADA			P
	(afetada)		1º Quartil	Mediana	3º Quartil		1º Quartil	Mediana	3º Quartil	
LPP	≥2	5	4,13	7,12	16,17	5	2,89	7,12	19,80	0,917
LPP	<2	5	2,74	2,74	14,12	5	11,89	16,50	34,48	0,050
AFF	≥2	6	5,00	5,00	5,00	6	5,00	8,59	12,54	0,138
AFF	<2	4	5,00	7,78	7,78	4	2,98	5,00	5,00	0,050

Legenda: CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, LPP – líquen plano pilar, AFF – alopecia frontal fibrosante. Teste de Wilcoxon ($P \leq 0,050$) Inflamação ≥ 2 : infiltrado linfocítico perifolicular moderado ou intenso na área afetada dos pacientes ao exame histopatológico. Inflamação <2: infiltrado linfocítico perifolicular leve ou irrelevante na área afetada dos pacientes ao exame histopatológico. Valores em pg/4mm.

Nota: Para o cálculo desta tabela, somente foi considerada a intensidade da inflamação nas áreas afetadas dos pacientes, devido ao pequeno número de participantes no estudo.

4.6 Técnica do ELISA - neuropeptídeos em amostras séricas

Não foi possível detectar a presença de SP e CGRP em nenhuma das amostras séricas, tanto aquelas provenientes dos pacientes com LPP e AFF, quanto as dos indivíduos controles.

Discussão

5. Discussão

Quando da publicação dos primeiros relatos de AFF no início da década de 90, a teoria mais aceita em relação à classificação desta forma de alopecia cicatricial era tratar-se de subtipo de LPP relacionado a alteração de níveis hormonais, devido a sua apresentação predominante em mulheres pós-menopausadas.^{9,10} Achados histopatológicos similares também apontavam para a possibilidade do LPP e da AFF serem espectro da mesma doença. No entanto, achados clínicos e laboratoriais recentes, bem como diferenças na resposta terapêutica e na evolução destas lesões, sinalizam uma nova perspectiva na patogênese da AFF.

Em relação às manifestações clínicas, pacientes com AFF costumam apresentar envolvimento precoce dos supercílios,¹¹ pápulas faciais,¹² líquen pigmentoso da face em fototipos mais elevados,¹³ e mais recentemente, pseudo “sinal da franja”,⁶⁵ achados estes que costumam estar ausentes no LPP. De acordo com a maior revisão atual da literatura sobre AFF publicada por Vañó-Galván *et al.*¹¹ em 2014, e que incluiu 355 pacientes com a doença, achados como alopecia de supercílios, alopecia dos pelos do corpo e pápulas faciais foram associados com formas mais graves da doença. No entanto, alopecia de supercílios como manifestação inicial foi relacionada com formas mais leves da doença.

No nosso estudo, pacientes com AFF apresentaram lesões clínicas mais restritas às áreas frontotemporais do couro cabeludo, em comparação com aqueles do grupo LPP, que comumente exibiam múltiplas placas difusas no couro cabeludo. Em relação às lesões extra-couro cabeludo, pacientes com AFF apresentaram com maior frequência alopecia dos pelos do corpo, alopecia dos supercílios, líquen plano pigmentoso e pápulas faciais. Contrariamente, nos pacientes com LPP houve maior acometimento de mucosas, unhas e pele, achados estes consistentes com os dados da literatura atual.⁶⁶⁻⁶⁸

Quanto ao exame histopatológico, 70% do total das biópsias realizadas nas áreas aparentemente não afetadas dos pacientes (70% do grupo LPP e 70% do grupo AFF) demonstraram infiltrado inflamatório perifolicular linfocítico típico, primariamente na região istmo-infundibular, além de fibrose perifolicular e mucina dérmica em alguns casos, achados compatíveis com o diagnóstico de alopecia cicatricial linfocítica primária. Tais achados histopatológicos sugerem que tanto o LPP quanto a AFF poderiam ser processos mais generalizados que afetam o couro cabeludo, mesmo na ausência de lesões aparentes.

Embora saibamos da limitação do corte vertical para visualização e quantificação da inflamação, salientamos que a intenção inicial do trabalho não era avaliar e quantificar os achados inflamatórios histopatológicos nestas regiões, mas sim, somente comprovar ou não o diagnóstico das doenças em estudo. Não foi possível distinguir características histopatológicas específicas do LPP e da AFF neste estudo.

Em relação à IFD, 45% do total das amostras estudadas, sendo 50% do grupo LPP e 40% do grupo AFF, mostraram resultados positivos nas áreas afetadas dos pacientes, em comparação a 30% nas áreas aparentemente não afetadas, sendo 40% no grupo LPP e 20% no grupo AFF. Pela primeira vez, identificamos resultados positivos na IFD em amostras de AFF, dados não condizentes com relatos da literatura que apontavam até então, resultados negativos do exame para esta doença.²⁴⁻²⁶

Embora não tenha sido possível encontrar um padrão específico de fluorescência entre áreas afetadas e aparentemente não afetadas e nem para cada doença, a presença de anticorpos positivos, mais frequentemente anti-IgM na zona da membrana basal, principalmente nas regiões aparentemente não afetadas de ambas as doenças, confirma a hipótese do acometimento difuso do couro cabeludo.

Embora anti-IgM seja considerado um anticorpo inespecífico, a ausência de fluorescência em amostras de pacientes com outros tipos de alopecia não cicatricial, como em uma série de casos de alopecia androgenética e eflúvio telógeno atendidos no Ambulatório de Tricologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, ressalta a relevância dos nossos achados, principalmente nas áreas aparentemente não afetadas dos pacientes (dados não publicados).

Em 2007, Peters *et al*⁶⁹ demonstraram uma maior sensibilidade do folículo piloso humano à SP, neuropeptídeo protótipo associado ao estresse. Após estímulo com SP, folículos pilosos cultivados responderam com desenvolvimento prematuro da fase catágena, inibição do seu receptor NK-1, e aumento na produção de endopeptidases degradantes da SP. O estudo mostrou também aumento da imunorreatividade da MHC classe I e β 2-microglobulina, indicando colapso do privilégio imune folicular e degranulação de mastócitos na bainha conjuntiva do pelo, decorrente de inflamação neurogênica.⁶⁹ Este estudo trouxe a primeira explicação biológica com evidência científica sobre como o estresse poderia desencadear ou agravar doenças como eflúvio telógeno e alopecia areata.⁶⁹

Evidências laboratoriais da relação entre PPAR- γ e os neuropeptídeos SP e CGRP no metabolismo lipídico foram demonstradas em artigos recentes.⁶⁹⁻⁷¹ *In vitro*, a SP estimulou a

produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, INF- γ , TNF- α , além do PPAR- γ , este último via receptor NK-1,^{71,72} enquanto o CGRP afetou negativamente a expressão do PPAR- γ . Desse modo, alterações na liberação fisiológica dos neuropeptídeos por fibras nervosas perivasculares poderiam resultar em desequilíbrio da regulação trófica vasomotora e da apresentação peribulbar de antígenos, perda prematura de cabelo e inibição de crescimento capilar.⁷³ Assim, os neuropeptídeos estariam relacionados não só com a perpetuação do quadro inflamatório, mas também com o processo reparador que ocorre nas alopecias cicatriciais, particularmente no LPP e suas variantes.

Em relação aos resultados do ELISA para os neuropeptídeos estudados no couro cabeludo, amostras com maior grau de inflamação no exame histopatológico (≥ 2) tiveram valores estatisticamente significativos para a expressão de SP em ambas as doenças ($P=0,046$ no grupo LPP e $P=0,050$). Por outro lado, graus menores de inflamação ao exame histopatológico (<2) tiveram valores significativos para a expressão de CGRP ($P=0,048$ no grupo LPP e $P=0,050$ no grupo AFF).

Amostras do couro cabeludo de indivíduos-controle tiveram resultados indetectáveis para os mesmos neuropeptídeos. Tais achados apontam para o papel imunorregulatório da SP, visto que a presença de inflamação pareceu facilitar ou aumentar a expressão de SP no tecido, diminuindo, ao mesmo tempo, a detecção de CGRP.

O possível mecanismo que poderia explicar tais achados seria de que a inflamação resultante do aumento das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , aumentaria também a liberação do neuropeptídeo inflamatório SP, através do seu receptor NK-1.^{73,74} Esta inflamação levaria então, a danos nas fibras nervosas perifoliculares, com consequente perda das mesmas. Estes dados podem ser confirmados pelos resultados de um estudo piloto realizado na Universidade de Minnesota (EUA), que evidenciou diminuição da densidade de fibras nervosas em amostras de áreas do couro cabeludo afetadas por LPP, em comparação a amostras de couro cabeludo sadio (dados não publicados).

A diminuição da liberação de CGRP pelas fibras nervosas perifoliculares então danificadas, levaria a um quadro de neuropatia de pequenas fibras, de maneira similar como ocorre no diabetes melito, justificando, de certa forma, os sintomas referidos por alguns pacientes com LPP e AFF.

Segundo publicações recentes, o CGRP teria função também imunossupressora. O CGRP protegeria células-tronco foliculares contra os efeitos de citocinas pró-inflamatórias, como INF- γ , função esta importante na manutenção do privilégio imune folicular.

Estudo *in vitro*, de amostras de couro cabeludo de pacientes com alopecia areata e indivíduos sadios, foi realizado com a intenção de avaliar os efeitos imunoprotetores do CGRP. Embora o CGRP administrado antes do INF- γ tenha demonstrado ser capaz de restabelecer o colapso induzido por esta citocina, o mesmo não foi capaz de restabelecer tal privilégio imune, uma vez que o folículo já tenha entrado em colapso.⁷⁴

Os resultados do nosso estudo referentes à expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP através da técnica de ELISA, demonstraram valores antagônicos nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas dos pacientes com LPP e AFF, sugerindo se tratarem possivelmente, de doenças com mecanismos fisiopatogênicos distintos. No entanto, não foi possível encontrar associação entre sinais clínicos, sintomas referidos pelos pacientes, intensidade da inflamação na histopatologia e expressão de neuropeptídeos no teste de ELISA.

A ausência de detecção dos neuropeptídeos através da técnica de ELISA em amostras séricas dos pacientes poderia supor que não exista comprometimento sistêmico das doenças, embora outros testes diagnósticos devam ser realizados para confirmar tal hipótese.

A identificação de um padrão específico de inflamação e alterações teciduais que ocorrem nas ACs é importante não só para seu diagnóstico preciso, mas também para definição das estratégias terapêuticas, através da melhor compreensão dos processos imunológicos envolvidos na destruição folicular.

Portanto, este estudo sugere que LPP e AFF sejam consideradas entidades distintas no espectro das alopecias cicatriciais linfocíticas primárias. A abordagem da AFF e do LPP como processos mais generalizados do couro cabeludo é fundamental para o manejo e planejamento terapêutico corretos destas enfermidades.

Estudos futuros com maior número de pacientes e que busquem otimizar a técnica de detecção dos neuropeptídeos em amostras cutâneas e no sangue certamente trarão novos conceitos em relação à patogênese, e também em relação a um novo horizonte de tratamentos para estas doenças tão desafiadoras na prática clínica dermatológica.

Conclusão

6. Conclusão

A presença dos neuropeptídeos SP e CGRP em amostras do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF e a ausência dos mesmos nas amostras de indivíduos-controle apontam para uma provável participação destes neuropeptídeos na patogênese do LPP e da AFF.

(1) Não foi possível observar correlação clínica entre expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP, sinais e sintomas inflamatórios e tempo de doença nos pacientes com LPP e AFF.

(2) Áreas aparentemente não afetadas do couro cabeludo de pacientes com LPP e AFF podem demonstrar inflamação ao exame histopatológico, sugerindo que ambas as doenças possam acometer de forma mais difusa o couro cabeludo, mesmo na ausência de sinais e sintomas típicos destas enfermidades.

(3) Achados da IFD não exibiram diferença de padrão entre as doenças nem entre as áreas afetadas e aparentemente não afetadas pelas doenças. A positividade deste exame nas áreas aparentemente não afetadas de pacientes com LPP e AFF constitui fato inédito na literatura e reforça a hipótese do acometimento subclínico e generalizado do couro cabeludo.

(4) A ausência de resultados detectáveis dos neuropeptídeos SP e CGRP através da técnica de ELISA nas amostras séricas de pacientes e controles poderia indicar a ausência de repercussões sistêmicas do LPP e da AFF, embora outros métodos diagnósticos sejam necessários para confirmar tal hipótese.

(5) A presença dos neuropeptídeos SP e CGRP nas áreas afetadas e aparentemente não afetadas de pacientes com LPP e AFF, encontrados no teste de ELISA sinaliza um importante papel da inflamação neurogênica na patogênese destas doenças. No entanto, a presença de resultados antagônicos em relação à expressão destes neuropeptídeos sugere mecanismos fisiopatológicos distintos entre ambas as doenças estudadas.

Anexos

7. Anexos

Anexo A - Cronograma

Pacientes

Visita 1 – Dia 0

- Critérios de inclusão e exclusão/Termo de consentimento\Questionários
- História médica, exame físico, medicações em uso
- Exames laboratoriais gerais
- Biópsias e coleta de sangue
- Preparo e armazenamento das amostras
- Fotografias

Visita 2 – Dia 14

- Retirada de pontos

Controles

Visita 1 – Dia 0

- Critérios de inclusão e exclusão/Termo de consentimento
- História médica, exame físico, medicações em uso
- Checagem de exames laboratoriais recentes (se houver)
- Biópsias e coleta de sangue
- Preparo e armazenamento das amostras
- Fotografias

Visita 2 – Dia 14

- Retirada de pontos

UMN:

- Preparo das amostras: 05 dias
- Realização dos testes de ELISA: 03 dias
- Leitura dos resultados: 01 dia

USP:

- Interpretação e análise estatística dos resultados: 15 dias.

Anexo B - Classificação de Fitzpatrick

FOTOTIPOS	CARACTERÍSTICAS	SENSIBILIDADE AO SOL
I- Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II- Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III- Morena clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV- Morena	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V - Morena escura	Queima raramente, bronzeia sempre	Pouco sensível
VI- Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

Classificação dos fototipos cutâneos proposta por Fitzpatrick (1975).

Anexo C - Aprovação do projeto de pesquisa – CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO: ESTUDO DA SUBSTANCIA P E DO PEPTÍDEO RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA NO LIQUEN PLANOPILAR

Pesquisador Responsável: Ricardo Romiti

Versão:

Pesquisador Executante: Isabella Doche

CAAE: 22052814.9.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10000

Número do Parecer: 673.917

Data da Relatoria: 04/06/2014

Apresentação do Projeto: O projeto intitulado Estudo da substancia P e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina no líquen planopilar (doutorado), será desenvolvido no HC FMUSP em conjunto com Universidade de Minnesota – EUA, portanto, trata-se de uma pesquisa com cooperação estrangeira.

Objetivo da Pesquisa: O protocolo tem o objetivo de:

- 1 - Quantificar e comparar a expressão dos neuropeptídeos SP e CGRP através da técnica de ELISA em amostras de couro cabeludo da área afetada versus não afetada de pacientes com LPP.
- 2 - Correlacionar a expressão destes neuropeptídeos com sinais inflamatórios, sintomas, tempo de doença e variantes clínicas.
- 3 - Estudar o papel da inflamação neurogênica no grupo LPP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco do estudo está no surgimento de hematoma transitório no local da colheita de sangue e na infecção, quelóide e ruptura da sutura nos locais de colheita das biopsias

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Projeto bem delineado metodologicamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Em acordo com as normas vigentes, especialmente quanto à metodologia e ao TCLE de modo satisfatório.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo D - Aprovação do projeto de pesquisa – Universidade de Minnesota (EUA)**UNIVERSITY OF MINNESOTA***Twin Cities Campus**Human Research Protection Program
Office of the Vice President for Research**D528 Mayo Memorial Building
420 Delaware Street S.E.
MMC 820
Minneapolis, MN 55455**Office: 612-626-5654
Fax: 612-626-6061
E-mail: irb@umn.edu or ibc@umn.edu
Website: <http://research.umn.edu/subjects/>*

08/23/2011

Maria K Hordinsky
Dermatology Department Ad
MMC 98
420 Delaware St SE
Minneapolis, MN 55455

RE: "Cutaneous Innervation in Skin Disease"
IRB Code Number: **9908M14521**

Dear Dr. Hordinsky,

The Institutional Review Board (IRB) received your response to its stipulations for renewal. Since this information satisfies the conditions set by the IRB, approval for the recent renewal is confirmed in our files.

The revised advertisement, dated August 8, 2011 is also approved.

For your records and for grant certification purposes, the approval date for the referenced project is December 16, 2009, and the Assurance of Compliance number is FWA00000312 (Fairview Health Systems Research FWA00000325, Gillette Children's Specialty Healthcare FWA00004003). Approval for the project will expire one year from that date. You will receive a report form two months before the expiration date.

As Principal Investigator of this project, you are required by federal regulations to inform the IRB of any proposed changes in your research that will affect human subjects. Changes should not be initiated until written IRB approval is received. Unanticipated problems and adverse events should be reported to the IRB as they occur. Results of inspections by any external regulatory agency (i.e. FDA) must be reported immediately to the IRB. Research projects are subject to continuing review.

If you have any questions, please call the IRB office at 612-626-5654.

The IRB wishes you continued success with your research.

Sincerely,

Felicia Mroczkowski, CIP
Research Compliance Supervisor
FM/mq
CC: Marna Ericson, Rina Farah, Ana Carina Junqueira

Driven to DiscoverSM

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – paciente

Estudo: *Estudo dos neuropeptídeos (substância P e CGRP) em biópsias de couro cabeludo e amostras sanguíneas de pacientes com líquen plano pilar e alopecia frontal fibrosante.*

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que visa estudar a quantidade de neuropeptídeos no tecido inflamado de pacientes com as doenças chamadas líquen plano pilar ou alopecia frontal fibrosante. No entanto, antes de assinar, por favor leia com atenção todas as informações da pesquisa e esclareça todas as suas dúvidas referentes a sua participação.

Você foi selecionado como um provável candidato para este estudo porque você tem uma destas doenças, que possivelmente estão ligadas a alterações de algumas substâncias na pele, como por exemplo a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que estariam envolvidos não só nos processos inflamatórios, mas também na produção dos sintomas presentes.

Este estudo será realizado pela Universidade de São Paulo e pela Universidade de Minnesota, nos Estados Unidos, envolvendo pacientes dos dois locais. A pesquisa será conduzida aqui pela Dra Isabella Doche e pelo Prof Dr Ricardo Romiti, chefe do Ambulatório de Tricologia (Cabelos) e nos Estados Unidos, pela Dra Maria K. Hordinsky, chefe do Departamento de Dermatologia da Universidade de Minnesota.

- **Por que esta pesquisa está sendo realizada?**

Recentemente, inúmeras pesquisas têm demonstrado a presença de algumas substâncias causadoras de inflamação, dentre elas a SP e o CGRP em diversas doenças. A proposta deste estudo é comparar a presença dessas substâncias nas áreas afetadas e não afetadas pela doença.

- **O que está envolvido neste estudo?**

Se você aceitar participar, todos os dados médicos do seu prontuário e do seu exame físico serão coletados, além de uma amostra sanguínea que poderá também ser utilizada para estudos futuros. Você será submetido a _____ (_____) biópsias no couro cabeludo, cada uma de mais ou menos 0,5 cm de diâmetro, em uma área doente e em outra área sadia. A área será anestesiada antes e você não sentirá nenhum desconforto. Após dez a quinze dias, os pontos podem ser removidos.

O material das biópsias será congelado e enviado para a Universidade de Minnesota nos Estados Unidos para análise. Você não terá qualquer custo com materiais ou exames pela sua participação.

- **Existe algum risco?**

Os riscos associados a este tipo de biópsia são BAIXOS e incluem pequeno sangramento no local, desconforto no momento do procedimento e a possibilidade de infecção no local. Uma pequena cicatriz pode permanecer no local após a remoção dos pontos.

- **Existe algum benefício por estar participando dessa pesquisa?**

Não. Os pacientes selecionados não receberão qualquer tipo de incentivo, benefício ou pagamento após a participação. O objetivo é contribuir para o estudo dessa doença e para o desenvolvimento de novos medicamentos no futuro.

- **O que acontece se eu tiver qualquer complicação decorrente da biópsia?**

Você deverá comunicar a(o) responsável pela pesquisa ou qualquer médico do Ambulatório de Tricologia, caso perceba qualquer intercorrência decorrente do procedimento para que o tratamento e medicações sejam fornecidos pelo hospital.

- **Minhas informações pessoais e sobre a minha doença serão expostas?**

Todos os dados coletados dos pacientes serão confidenciais e somente as pessoas envolvidas na pesquisa terão acesso. Caso sejam publicados, sua identidade será mantida e ninguém poderá identificá-lo (a).

- **Quais são os meus direitos sobre a participação nessa pesquisa?**

A participação nessa pesquisa é VOLUNTÁRIA e você pode decidir por participar ou não. Sua relação em não participar não afetará de forma alguma o seu tratamento no ambulatório ou a sua relação com os médicos envolvidos ou com os profissionais do hospital. O resultado dessa pesquisa não afetará o início do seu tratamento com as medicações atualmente disponíveis no hospital e aprovadas para estas doenças.

Caso tenha qualquer dúvida em relação a esta pesquisa, compareça às quintas-feiras das 13 às 16 horas no ambulatório de Tricologia do Hospital das Clínicas da USP para falar com os responsáveis pela pesquisa. Você receberá uma cópia desse formulário para guardar.

EU LI ESTE TERMO DE CONSENTIMENTO E TIVE A OPORTUNIDADE DE ESCLARECER TODAS AS DÚVIDAS RELACIONADAS A ESTA PESQUISA. EU ACEITO PARTICIPAR DESSE ESTUDO.

Nome do(a) paciente

Assinatura do(a) paciente

Data da assinatura

Nome do(a) pesquisadora responsável

Assinatura do(a) pesquisadora responsável

Data da assinatura

Anexo F - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - controle

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que visa estudar a quantidade de neuropeptídeos (substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) no tecido inflamado e na amostra sanguínea de pacientes com as doenças chamadas líquen plano pilar e alopecia frontal fibrosante. Você foi selecionado como indivíduo controle, ou seja, por NÃO apresentar nenhuma das duas doenças e seus resultados serão utilizados para comparar com aqueles obtidos de pacientes.

No entanto, antes de assinar, por favor leia com atenção todas as informações da pesquisa e esclareça todas as suas dúvidas referente a sua participação.

Este estudo será realizado pela Universidade de São Paulo e pela Universidade de Minnesota, nos Estados Unidos, envolvendo pacientes e indivíduos controles (sadios) dos dois locais. A pesquisa será conduzida aqui pela Dra Isabella Doche e pelo Prof Dr Ricardo Romiti, chefe do Ambulatório de Tricologia (Cabelos) e nos Estados Unidos, pela Dra Maria K. Hordinsky, chefe do Departamento de Dermatologia da Universidade de Minnesota.

- **Por que esta pesquisa está sendo realizada?**

Recentemente, inúmeras pesquisas têm demonstrado a presença de algumas substâncias causadoras de inflamação como a Substância-P e o CGRP em diversas doenças. A proposta deste estudo é comparar a presença dessa substância em biópsias e amostras sanguíneas de pacientes com tais doenças em relação aos indivíduos sadios.

- **O que está envolvido neste estudo?**

Se você aceitar participar, serão colhidas uma amostra sanguínea para estudos futuros e _____ (_____) biópsias no couro cabeludo, cada uma de mais ou menos 0,5 cm de diâmetro. A área será anestesiada antes e você não sentirá nenhum desconforto. Após dez a quinze dias, os pontos podem ser removidos. O material das biópsias será congelado e enviado para a Universidade de Minnesota nos Estados Unidos para análise. Você não terá qualquer custo com materiais ou exames pela sua participação.

- **Existe algum risco?**

Os riscos associados a este tipo de biópsia são BAIXOS e incluem pequeno sangramento no local, desconforto no momento do procedimento e a possibilidade de infecção no local. Uma pequena cicatriz pode permanecer no local após a remoção dos pontos.

- **Existe algum benefício por estar participando dessa pesquisa?**

Não. Os pacientes selecionados não receberão qualquer tipo de incentivo, benefício ou pagamento após a participação. O objetivo é contribuir para o estudo dessas doenças e o desenvolvimento de novos medicamentos no futuro.

- **O que acontece se eu tiver qualquer complicação decorrente da biópsia?**

Você deverá comunicar a(o) responsável pela pesquisa ou qualquer médico do Ambulatório de Tricologia, caso perceba qualquer intercorrência decorrente do procedimento para que o tratamento e medicações sejam fornecidos pelo hospital.

- **Minhas informações pessoais e sobre a minha doença serão expostas?**

Todos os dados coletados dos pacientes serão confidenciais e somente as pessoas envolvidas na pesquisa terão acesso. Caso sejam publicados, sua identidade será mantida e ninguém poderá identificá-lo (a).

- **Quais são os meus direitos sobre a participação nessa pesquisa?**

A participação nessa pesquisa é VOLUNTÁRIA e você pode decidir por participar ou não. Sua decisão em não participar não afetará de forma alguma o seu tratamento no ambulatório ou a sua relação com os médicos envolvidos ou com os profissionais do hospital.

Caso tenha qualquer dúvida em relação a esta pesquisa, compareça às quintas-feiras das 13 às 16 horas no ambulatório de Tricologia do Hospital das Clínicas da USP para falar com os responsáveis pela pesquisa. Você receberá uma cópia desse formulário para guardar.

EU LI ESTE TERMO DE CONSENTIMENTO E TIVE A OPORTUNIDADE DE ESCLARECER TODAS AS DÚVIDAS RELACIONADAS A ESTA PESQUISA. EU ACEITO PARTICIPAR DESSE ESTUDO.

Nome do(a) paciente

Assinatura do(a) paciente

Data da assinatura

Nome do(a) pesquisadora responsável

Assinatura do(a) pesquisadora responsável

Data da assinatura

Anexo G - Checklist para o investigador

PROJETO: Estudo da Substância P e do Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina em biópsias de couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar e alopecia frontal fibrosante.

Instituições envolvidas: Universidade de Sao Paulo (BRA) e Universidade de Minnesota (EUA)

Iniciais do paciente: _____ **Data:** _____

FEMININO / MASCULINO

FOTOTIPO: I II III IV V VI

DATA DE NASC: _____

SEÇÃO 1: ASSINALAR COM SIM OU NÃO**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:**

- Outros tipos de alopecia associadas, por ex, alopecia androgenética ou eflúvio telógeno na mesma região da biópsia: SIM NÃO
- Paciente imunodeprimido (HIV, história de transplante, câncer, quimioterapia, esplenectomia): SIM NÃO
- Cefaléia aguda ou crônica, neuropatias ou dor crônica em outros locais do corpo que não couro cabeludo: SIM NÃO
- Paciente com diabetes, hipertensão, hipo ou hipertireoidismo ou doenças não estáveis há pelo menos 6 meses: SIM NÃO
- Aplicação tópica de imunomoduladores ou imunossupressores nos últimos 12 meses: SIM NÃO
- Aplicação de agentes neuromoduladores que podem alterar o SNP ou SNC (como capsaicina, gabapentina, pregabalina, antidepressivos tricíclicos, carbamazepina, fenitoína, topiramato, lamotrigina, morfina ou toxina botulínica) nos últimos 2 meses: SIM NÃO
- Administração sistêmica de corticosteróides ou outros agentes sistêmicos (por ex. metotrexato, fototerapia), com mecanismo imunossupressor ou imunomodulador nas últimas 12 semanas: SIM NÃO
- Exposição solar excessiva nas últimas 48 horas: SIM NÃO
- Evidência clínica de infecção secundária ou comprometimento da barreira cutânea do couro cabeludo: SIM NÃO

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Pacientes com qualquer tipo de LPP ativo confirmado por biópsia: SIM NÃO
- Pelo menos um sintoma associado à inflamação: dor, queimação, formigamento, parestesia, irritação, prurido OU um sinal de inflamação: eritema peripilar, eritema difuso ou descamação peripilar) na área afetada: SIM NÃO
- Homens ou mulheres maiores de 18 anos: SIM NÃO
- Pacientes aptos a fornecerem consentimento e questionários para a pesquisa: SIM NÃO
- Pacientes dispostos a aderir ao estudo, incluindo exame do couro cabeludo, fotos, biópsias e coleta sanguínea: SIM NÃO
- Outras infecções ou inflamações que possam alterar a avaliação durante o estudo: SIM NÃO
- Ausência de sinais ou sintomas de inflamação: SIM NÃO
- Uso de medicações em investigação nos últimos 30 dias: SIM NÃO
- Suscetibilidade a formação de quelóides: SIM NÃO
- Alergias graves ou reações de anafilaxia a lidocaína: SIM NÃO

SEÇÃO 2:

Área afetada: _____ Área não afetada: _____

Número de biópsias: _____

HE \ ELISA \ IFD

AMOSTRA SANGUÍNEA: SIM NÃO

FOTOS: SIM NÃO

SEÇÃO 3:

- Início das lesões: _____ anos/meses/dias
- Início dos sintomas: _____ anos/meses/dias
- Lesões extra-couro cabeludo: SIM NÃO Se sim, onde: _____
- Paciente fumante: SIM NÃO Se sim, desde quando: _____
- Paciente usuário de droga: SIM NÃO Se sim, desde quando: _____
- Ingestão de álcool regularmente: SIM NÃO Se sim, desde quando: _____

- Nota para os sintomas HOJE: **de 0 (sem sintomas) a 5 (muito importantes):**

DOR: 0 1 2 3 4 5

QUEIMAÇÃO: 0 1 2 3 4 5

ARDOR: 0 1 2 3 4 5

FORMIGAMENTO: 0 1 2 3 4 5

- Sinais de inflamação na área afetada:

ERITEMA DIFUSO: 0 (-) 1(+/-) 2 (++) 3 (+++)

ERITEMA PERIPILAR: 0 (-) 1(+/-) 2 (++) 3 (+++)

DESCAMAÇÃO PERIPILAR: 0 (-) 1(+/-) 2 (++) 3 (+++)

NOME DA PESSOA QUE CONDUZIU O ESTUDO

Anexo H – Outros

CARTA DE APOIO – UNIVERSIDADE DE MINNESOTA

Dear Committee Members:

RE: Letter of Support for Dr. Isabella Doche's Project: Study of the Neuropeptide CGRP in Scalp Biopsies from Patients with Lichen Planopilaris

I am writing to enthusiastically support Dr. Isabella Doche's project on neurogenic inflammation in the cicatricial alopecias, particularly lichen plano pilaris and a clinical variant of this disease known as frontal fibrosing alopecia. This project was designed by Dr. Doche as part of her thesis work. The goal is to study at least 20 patients and 15 control subjects and involves the acquisition of two scalp biopsy specimens from each subject as well as a blood sample.

Our role in her project here at the University of Minnesota has been to provide laboratory and imaging expertise as well as financial support for her studies of nerves and neuropeptides, particularly calcitonin gene related peptide but also Substance P, in both affected and unaffected scalp skin and blood samples. Dr. Doche has not only worked closely with me but also with George Wilcox, PhD, Professor of Neuroscience, and expert in pain research and Marna Ericson, PhD, Assistant Professor of Dermatology and expert in cutaneous imaging. Together we have been summarizing our work as it evolves with presentations at the Society for Investigative Dermatology meeting in the United States and earlier this year at the International World Congress of Hair Research held in Edinburgh, Scotland.

In addition to the academic support noted previously we also provide financial support to her project. Samples collected from the University of Sao Paulo have been studied and will continue to be studied here at the University of Minnesota using different techniques such as ELISA assays as well as with different immunohistochemical techniques and confocal microscopic imaging.

It has been and continues to be a pleasure to support Dr. Doche's work both academically and financially. Some of the costs incurred in this study which have been in large part supported by funds from the Goltz Professorship in Neurodermatology include the following:

- 1. Shipment of samples from the University of Sao Paulo to the University of Minnesota x 2 \$2,000.00*

2. ELISA CGRP and SP (human) kits, \$515.00 each times 10 \$5,150.00

3. Imaging Fees for use of the Biomedical Imaging Center \$500.00

4. Other reagents and supplies \$500.00

A copy of the written approval from our Institutional Review Board for this project has been sent earlier to Dr. Doche to submit to the University of Sao Paulo Ethics Committee. The approval number at the University of Minnesota is 9908M14521. The study at our institution is titled Cutaneous Innervation in Skin Diseases.

In summary, we enthusiastically support Dr. Doche's project and look forward to continuing to advance this area of dermatology/neuroscience through this joint collaboration. Please let me know if you have any questions.

Sincerely,

Maria Hordinsky, MD Chair and Professor Department of Dermatology

cc: Kathleen Kane, Clinical Research Coordinator Marna Ericson, PhD, Department of Dermatology George Wilcox, PhD, Departments of Neuroscience and Dermatology.

TRADUÇÃO (CARTA DE APOIO – UNIVERSIDADE DE MINNESOTA)

Universidade de Minnesota (EUA)

Carta de apoio ao projeto de pesquisa da Dra Isabella Doche – Estudo do neuropeptídeo CGRP em biópsias de couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar.

28 de Agosto de 2013

Ao Comitê de Ética

Universidade de São Paulo

São Paulo, Brasil

Prezados Membros do Comitê:

É com grande entusiasmo, que escrevo essa carta para apoiar o projeto de pesquisa da Dra Isabella Doche, que se refere ao estudo da inflamação neurogênica nas alopecias

cicatriciais, particularmente líquen plano pilar e sua variante clínica, alopecia frontal fibrosante. Este projeto foi desenhado pela Dra Doche como parte do projeto de pesquisa para sua tese. O objetivo deste estudo é incluir por volta de 20 pacientes e 15 controles, os quais serão submetidos a duas biópsias de couro cabeludo e amostras sanguíneas cada um.

Nosso papel, nesse projeto aqui na Universidade de Minnesota, tem sido promover ferramentas laboratoriais e de imagem, assim como suporte financeiro para o estudo dos nervos e dos neuropeptídeos, particularmente do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e também da substância P, em biópsias e amostras sanguíneas dos indivíduos afetados e não afetados. A Dra Doche não só tem trabalhado intimamente comigo, mas também com outros membros da nossa equipe de pesquisa, como o professor e PhD George Wilcox, professor de neurociências e especialista em pesquisa relacionadas a dor e a PhD Marna Ericson, professora assistente de Dermatologia e especialista em imagens cutâneas. Juntos temos apresentados nossos resultados preliminares na Sociedade de Dermatologia Investigativa nos Estados Unidos e esse ano, no congresso Internacional de Pesquisa em Cabelos que ocorreu em Edimburgo, Escócia.

Além do apoio acadêmico, nós também estamos oferecendo apoio financeiro para este projeto. As amostras colhidas na Universidade de São Paulo serão estudadas na Universidade de Minnesota através de diferentes técnicas como ELISA, técnicas de imunohistoquímica e microscopia confocal.

Tem sido um grande prazer e espero que continue sendo, trabalhar com a Dra Isabella Doche e oferecer tal suporte tanto acadêmico quanto financeiro. Alguns custos com este projeto serão financiados por fundos da Associação Goltz em Neurodermatologia e incluem:

- Envio de amostras da Universidade de São Paulo para a Universidade de Minnesota x 2 = U\$ 2.000,00
- Kits ELISA para CGRP e SP U\$ 515,00 cada x 10 = U\$ 5.150,00
- Taxas para uso do Centro de Imagens Biomédicas = U\$ 500,00
- Outros reagentes e materiais = U\$ 500,00

Uma cópia da aprovação pelo nosso Comitê Institucional para Pesquisa foi anexada para ser apresentada juntamente a este comitê. O número da aprovação do projeto na Universidade de Minnesota é 9908M14521, com o título de Inervação Cutânea nas Doenças de Pele.

Em resumo, é com grande entusiasmo que apoiamos o projeto de pesquisa da Dra Isabella Doche e ansiamos por continuar avançando na área de dermatologia/neurociências, através desta colaboração conjunta. Por favor, me avisem caso tenham algum questionamento.

Atenciosamente,

Dra Maria K.Hordinsky
Chefe e Professora
Departamento de Dermatologia

Copia: Kathleen Kane, Coordenadora de Pesquisas Clínicas
Marna Ericson, PhD, Depto de Dermatologia
George Wilcox, PhD, Deptos de Dermatologia e Neurociência

ORÇAMENTO DETALHADO

1. Envio de amostras da Universidade de São Paulo para a Universidade de Minnesota
x 2 = U\$ 2.000,00
2. Kits ELISA para SP (human Cayman®) U\$ 215,00 cada x 10 – U\$ 2.150,00
3. Kits ELISA para CGRP (human Cayman®) U\$ 515,00 cada x 10 = U\$ 5.150,00
4. Taxas de uso do Centro de Imagens Biomédicas (Universidade de Minnesota) = U\$ 500,00
5. Outros reagentes e materiais = U\$ 500,00

TOTAL ESTIMADO: U\$ 10.300,00 para n= 20 pacientes e controles

O financiamento da pesquisa será feito pelo Departamento de Dermatologia da Universidade de Minnesota e pela CARF (*Cicatricial Alopecia Research Foundation*) através de verbas já aprovadas.

Este estudo é braço de uma pesquisa que vem sendo realizado na Universidade de Minnesota para a avaliação de diversos neuropeptídeos, entre eles a substância P e o CGRP em biópsias de pacientes com LPP, incluindo técnicas de ELISA e microscopia confocal.

LISTA DOS PAÍSES PARTICIPANTES

1. BRASIL – Universidade de São Paulo
Responsável: Prof Dr Ricardo Romiti,
Prof Dra Neusa Valente

2. ESTADOS UNIDOS – Universidade de Minnesota
Responsável: Maria K. Hordinsky, MD
George Wilcox, PhD
Marna Ericson, PhD

CAPA DOS KITS UTILIZADOS (CAYMAN®)**Substance P EIA Kit**

Item No. 583751

European patent # 89 139 552
U.S. patent # 5,047,330

**HUMAN CGRP
ENZYME IMMUNOASSAY KIT
A05481 - 96 Wells**

**For research laboratory use only.
Not for human diagnostic use.**

**This assay has been developed
and validated by SPI-BIO.**

Referências

8 Referências

1. Rebora A, Guarrera M. Kenogen. A new phase of the hair cycle? *Dermatology*. 2002;205(2):108-10.
2. Stefanato CM. Histopathology of alopecia: a clinicopathological approach to diagnosis. *Histopathology*. 2010;56(1):24-38.
3. Olsen EA, Bergfeld WF, Cotsarelis G, Price VH, Shapiro J, Sinclair R, Solomon A, Sperling J, Stenn K, Whiting DA, Bernardo O, Bettencourt M, Bolduc C, Callender V, Elston D, Hickman J, Ioffreda M, King L, Linzon C, McMichael A, Miller J, Mulinari F, Trancik R. Summary of North American Hair Research Society (NAHRS)- sponsored Workshop on Cicatricial Alopecia, Duke University Medical Center. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(1):103-10.
4. Sehgal VN, Bajaj P, Srivastva G. Lichen planopilaris [cicatricial (scarring) alopecia] in a child. *Int J Dermatol*. 2001;40(7):461-3.
5. Nanda A, Al-Ajmi HS, Al-Sabah H, Al-Hasawi F, Alsaleh QA. Childhood lichen planus: a report of 23 cases. *Pediatr Dermatol*. 2001;18(1):1-4.
6. Sharma R, Maheshwari V. Childhood lichen planus: a report of fifty cases. *Pediatr Dermatol*. 1999;16(5):345-8.
7. Handa S, Sahoo B. Childhood lichen planus: a study of 87 cases. *Int J Dermatol*. 2002;41(7):423-7.
8. Mehregan DA, Van Hale HM, Muller AS. Lichen planopilaris: clinical and pathologic study of forty-five patients. *J Am Acad Dermatol*. 1992;27(6 Pt 1):935-42.
9. Kossard S. Postmenopausal frontal fibrosing alopecia. Scarring alopecia in a pattern distribution. *Arch Dermatol*. 1994;130(6):770-4.
10. Kossard S, Lee M, Wilkinson B. Postmenopausal frontal fibrosing alopecia: a frontal variant of lichen planopilaris. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(1):59-66.
11. Vañó-Galván S, Molina-Ruiz AM, Serrano-Falcón C, Arias-Santiago S, Rodrigues-Barata AR, Garnacho-Saucedo G, Martorell-Calatayud A, Fernández-Crehuet P, Grimalt R, Aranegui B, Grillo E, Diaz-Ley B, Salido R, Pérez-Gala S, Serrano S, Moreno JC, Jaén P, Camacho FM. Frontal fibrosing alopecia: a multicenter review of 355 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(4):670-8.
12. Donati A, Molina L, Doche I, Valente NS, Romiti R. Facial papules in frontal fibrosing alopecia: evidence of vellus follicle involvement. *Arch Dermatol*. 2011;147(12):1424-7.
13. Dlova NC. Frontal fibrosing alopecia and lichen planus pigmentosum: is there a link? *Br J Dermatol*. 2013;168(2):439-42.

14. Yorulmaz A, Artuz F, Er O, Guresci S. A case of Graham-Little-Piccardi-Lasseur syndrome. *Dermatol Online J*. 2015;21(6). Available from:<http://www.pii:13030/qt7gj157xg>.
15. Mirmirani P. Cicatricial Alopecia. In: McMichael AJ, Hordinsky MK, editors. *Hair and scalp diseases-medical, surgical, and cosmetic treatments*. New York:Informa; 2008. 137-48.
16. Chiang C, Sah D, Cho BK, Ochoa BE, Price VH. Hydroxychloroquine and lichen planopilaris: efficacy and introduction of Lichen Planopilaris Activity Index scoring system. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(3):387-92.
17. Assouly P, Reygagne P. Lichen planopilaris: update on diagnosis and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2009;28(1):3-10.
18. Silvers DN, Katz BE, Young AW. Pseudopelade of Brocq is lichen planopilaris: report of four cases that support this nosology. *Cutis*. 1993;51(2):99-105.
19. Christoph T, Müller-Röver S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Rückert R, Paus R. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol*. 2000;142(5):862-73.
20. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 2000;102(4):451-61.
21. Mobini N, Tam S, Kamino H. Possible role of bulge region in the pathogenesis of inflammatory scarring alopecia: lichen planopilaris as the prototype. *J Cutan Pathol*. 2005;32(10):675-9.
22. Stenn KS, Cotsarelis G, Price VH. Report from cicatricial alopecia colloquium. *J Invest Dermatol*. 2006;126(3):539-41.
23. Karnik P, Smetanick M, McKormick TS, Mirmirani P. Microarray- based gene expression profiling in primary cicatricial alopecia implicates p53-dependent abnormal cytokine production, concurrent apoptosis and tissue remodelling in disease pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2005, 124:A79.
24. Chew AL, Bashir SJ, Wain EM, Fenton DA, Stefanato CM. Expanding the spectrum of frontal fibrosing alopecia: a unifying concept. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(4):653-60.
25. Poblet E, Jiménez F, Pascual A, Piqué E. Frontal fibrosing alopecia versus lichen planopilaris: a clinicopathological study. *Int J Dermatol*. 2006;45(4):375-80.
26. Moreno-Ramírez D, Ferrándiz L, Camacho FM. Diagnostic and therapeutic assessment of frontal fibrosing alopecia. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98(9):594-602.
27. Karnik P, Tekest Z, McCormick TS, Gilliam AC, Price VH, Cooper KD, Mirmirani P. Hair follicle stem cells-specific PPARgamma deletion causes scarring alopecia. *J Invest Dermatol*. 2009;129(50):1243-57.

28. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003;139(11):1479-88.
29. Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R, Scholzen TE. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*. 2006;126(9):1937-47.
30. Arulmani U, Maassenvandenbrink A, Villalón CM, Saxena PR. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1-3):315-30.
31. Villalón CM, Olesen J. The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs. *Pharmacol Ther*. 2009;124(3):309-23.
32. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*. 2010;17(6):504-16.
33. González Moles MA, Esteban F, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Brener S, Bascones-Martinez A, Muñoz M. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Dis*. 2009;15(2):162-9.
34. Gonzalez-Moles MA, Brener S, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Tostes D, Bravo M, Esteban F. Substance P and NK-1R expression in oral precancerous epithelium. *Oncol Rep*. 2009;22(6):1325-31.
35. Esteban F, Gonzalez-Moles MA, Castro D, Martin-Jaen Mdel M, Redondo M, Ruiz-Avila I, Muñoz M. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*. 2009;54(2):258-60.
36. Bak H, Lee WJ, Lee YW, Chang SE, Choi JH, Kim MN, Kim BJ, Choi YS, Suh HS. Expression of neuropeptides and their degrading enzymes in ACD. *Clin Exp Dermatol*. 2010;135(3):318-23.
37. Antúnez C, Torres MJ, López S, Rodrigues-Pena R, Blanca M, Mayorga C, santamaría-Babi LF. Calcitonin gene-related peptide modulates interleukin-13 in circulating cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive T cells in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2009;161(3):547-53.
38. Kim HO, Lee CH, Ahn HK, Park CW. Effects of tacrolimus ointment on the expression of substance P, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in atopic dermatitis. *Int J dermatol*. 2009;48(4):431-8.
39. Yamaguchi J, Aihara M, Kobayashi Y, Kambara T, Ikezawa Z. Quantitative analysis of nerve growth factor (NGF) in the atopic dermatitis and psoriasis horny layer and effect of treatment on NGF in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2009;53(1):48-54.

40. Saraceno R, Kleyn CE, Terenghi G, Griffiths CE. The role of neuropeptides in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2006;155(5):876-82.
41. Reich A, Szepietowski JC. Vasoactive peptides in the pathogenesis of psoriasis. *G Ital Dermatol Venereol*. 2008;143(5):289-98.
42. Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Psoriatic keratinocytes express high levels of nerve growth factor. *Acta Derm Venereol*. 1998;78(2):84-6.
43. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res*. 2004;146:433-7.
44. Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. NGF and its receptor system: a new dimension in the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:470-7.
45. Borici-Mazi R, Kouridakis S, Kontou-Fili K. Cutaneous responses to substance P and calcitonin gene-related peptide in chronic urticaria: the effect of cetirizine and dimethindene. *Allergy*. 1999;54(1):46-56.
46. McAleer MA, Lacey N, Powell FC. The pathophysiology of rosacea. *G Ital Dermatol Venereol*. 2009;144(6):663-71.
47. Cetin ED, Savk E, Uslu M, Eskin M, Karul A. Investigation of the inflammatory mechanisms in alopecia areata. *Am J Dermatopathol*. 2009;31(1):53-60.
48. Siebenhaar F, Sharov AA, Peters EM, Sharova TY, Syska W, Mardaryev AN, Freyschmidt-Paul P, Sundberg JP, Maurer M, Botchkarev VA. Substance P as an immunomodulatory neuropeptide in a mouse model for autoimmune hair loss (alopecia areata). *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1489-97.
49. Gilhar A, Paus R, Kalish RS. Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2019-27.
50. Brener S, González-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Bravo M, Muñoz M. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009;29(6):2323-9.
51. Nissalo S, Hietanen J, Malmström M, Hukkanen M, Polak J, Konttinen YT. Disorder-specific changes in innervation in oral lichen planus and lichenoid reactions. *J Oral Pathol Med*. 2000; 29(8):361-9.
52. Doche I, Hordinsky K, Wilcox GL, Valente NS, Romiti R. Substance P in keratosis follicularis spinulosa decalvans, *J Am Acad Dermatol Case Reports*. 2015;1:327-8. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdcr.2015.08.001>
53. Cotsarelis F, Sun TT, 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(7):1329-37.

54. Bevan S, Szolcsányi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11(8):330-3.
55. Paus R, Heinselmann T, Schultz KD, Furkert J, Fechner K, Czarnetzi BM. Hair growth induction by substance P. *Lab Invest.* 1994;71(1):134-40.
56. Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. *Neuropeptides.* 2006;40(4):251-63.
57. Jessel TM. The role of substance P in sensory transmission and pain perception. In: Martin JB, Reichlin S, Bick KL, editors. *Neurosecretion and Brain Peptides: Implications for Brain Function and Neurological Disease.* New York: Raven Press; 1981. 189-98.
58. Leeman SE, Mroz EA. Substance P. *Life Sci.* 1974;15(12):2033-44.
59. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev.* 1983;35(2):85-141.
60. Dimitriadou V, Buzzi MG, Theoharides TC, Moskowitz MA. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neuroscience.* 1992;48(1):187-203.
61. Nong YH, Titus RG, Ribeiro JM, Remold HG. Peptide encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol.* 1989;143(1):45-9.
62. Samuelov L, Kinori M, Bertolini M, Paus R. Neural controls of human hair growth: calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces catagen. *J Dermatol Sci.* 2012;67(2):153-5.
63. Toyoda M, Luo Y, Makino T, Matsui C, Morohashi M. Calcitonin gene-related peptide upregulates melanogenesis and enhances melanocyte dendricity via induction of keratinocyte-derived melanotrophic factors. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1999;4(2):116-25.
64. Zhou J, Feng JY, Wang Q, Shang J. Calcitonin gene-related peptide cooperates with Substance P to inhibit melanogenesis and induces apoptosis of B16F10 cells. *Cytokine.* 2015;74(1):137-44.
65. Pirmez R, Duque-Estrada B, Abraham LS, Pinto GM, de Farias DC, Kelly Y, Doche I. It's not all traction: the pseudo 'fringe- sign' in frontal fibrosing alopecia. *Br J Dermatol.* 2015;173(5):1336-8.
66. Banka N, Mubki T, Bunagan MJ, McElwee K, Shapiro J. Frontal fibrosing alopecia: a retrospective clinical review of 62 patients with treatment outcome and long-term follow-up. *Int J Dermatol.* 2014;53(11):1324-30.
67. MacDonald A, Clark C, Holmes S. Frontal fibrosing alopecia: a review of 60 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(5): 955-61.
68. Samrao A, Chew AL, Price V. Frontal fibrosing alopecia: a clinical review of 36 patients.

Br J Dermatol. 2010;163(6):1296-300.

69. Peters EM, Liotiri S, Bodó E, Hagen E, Biró T, Arck PC, Paus R. Probing the effects of stress mediators on the human hair follicle. *Am J Pathol.* 2007;171(6):1872-86.
70. Trivedi NR, Cong Z, Nelson AM, Albert AJ, Rosamilia LL, Sivarajah S, Gilliland KL, Liu W, Mauger DT, Gabbay RA, Thiboutot DM. Peroxisome proliferator-activated receptors increase human sebum production. *J Invest Dermatol.* 2006;126(9):2002-9.
71. Lee WJ, Jung HD, Lee HJ, Kim BS, Lee SJ, Kim do W. Influence of substance-P on cultured sebocytes. *Arch Dermatol Res.* 2008;300(6):311-6.
72. Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Ribichini F, Brunelleschi S. A novel activity for substance-P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma protein expression in human monocytes and macrophages. *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):144-52.
73. Cutrer FM, Sandroni P, Wendelschafer-Crabb G. Botulinum toxin treatment of cephalgia alopecia increases substance P and calcitonin gene-related peptide-containing cutaneous nerves in the scalp. *Cephalalgia.* 2009;30(8):1000-6.
74. Kinori M, Bertolini M, Funk W, Samuelov L, Meyer KC, Emelianov VU, Hasse S, Paus R. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) may award relative protection from interferon- γ -induced collapse of human hair follicle immune privilege. *Exp Dermatol.* 2012; 21(3):223-6.