Gabriella Di Giunta

**Células dendríticas, expressão da forma
induzida da óxido nítrico sintase e padrão de
citocinas nas lesões de pitiríase liquenóide**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Di Giunta, Gabriella

Células dendríticas, expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase e padrão de citocinas nas lesões de pitíriase liquenóide / Gabriella Di Giunta. -- São Paulo, 2008.

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

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Mirian Nacagami Sotto.

Descritores: 1.Pitíriase liquenóide/fisiopatologia 2.Óxido nítrico
3.Imunoistoquímica 4.Interleucinas/análise

USP/FM/SBD-027/08

Dedicatória

*Ao meu marido **Luis Fernando** por ser ele tudo o que eu sempre desejei, pelo seu enorme amor e dedicação a mim e pela satisfação com conquistas minhas mais do que com as próprias.*

*Ao meu filho **Luis Felipe** que dividiu com esta tese a atenção nestes primeiros e preciosos momentos da sua vida.*

*Aos meus pais **Alice** e **Giovanni**, por terem me ensinado a prezar a busca pelo conhecimento, e terem me proporcionado uma criação primorosa baseada no amor, sendo esta o reflexo de tudo o que eu tenho e sou hoje.*

*Aos meus irmãos **Loretta**, **Valeria**, **Giovanni** e **Leonardo**, que tornam a minha família ainda melhor.*

*Ao meu avô **Carmelo** que como um apaixonado pela medicina, foi um grande inspirador.*

*Aos meus sogros **Madi** e **Ayrton Funchal**, por sua genialidade e por terem me dado ainda mais provas de que o conhecimento e a cultura são elementos indispensáveis para o crescimento.*

Agradecimentos especiais

À minha orientadora **Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto** que é o um ideal de orientadora, de profissional e de pessoa, agradeço pela oportunidade de ter trabalhado ao seu lado.

À **Profa. Helena Muller**, por ter me iniciado, com um brilhantismo único, no campo da dermatopatologia.

À amiga **Cláudia Pinto Figueiredo** pela sua paciência, inteligência e boa disposição em fazer as mais diversas coisas para que tudo fosse mais fácil para mim.

À **Ana Maria Gonçalves Silva**, também uma amiga, que me mostrou o que é ser competente, caprichosa e comprometida simplesmente pelo prazer de sê-lo.

A **Cristina, Jaqueline e Ivete**, pelos maravilhosos cortes das minhas lâminas, e por terem me ouvido e dado atenção às minhas angústias.

A **Carla e Elaine** que foram incansáveis em conseguir algumas reações “impossíveis”, feitas sempre com um enorme sorriso no rosto.

A **Fernanda, Rose, Rosana, Nayura**, pelos conselhos e por terem me aceitado no seu ambiente de trabalho tão alegre e me auxiliado sempre com enorme carinho e disposição.

A todos os funcionários da dermatologia que sempre me trataram como se eu fosse um deles.

Aos colegas de trabalho do IDAP e do Hospital Universitário em Florianópolis, por terem aceitado e compreendido as minhas freqüentes ausências durante estes quatro anos.

Epígrafe

*As it takes two to make a quarrel,
so it takes two to make a disease,
the microbe and its host.*

Charles V. Chapin

Esta tese está de acordo com:

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1 Resposta imune cutânea na Pitíriase liquenóide.....	5
1.2 Óxido nítrico	6
2. Objetivos.....	8
3. Revisão da literatura.....	11
3.1 Histórico	12
3.1.1 Epidemiologia	13
3.1.2 Quadro Clínico.....	13
3.1.3 Histopatologia	15
3.1.4 Fisiopatologia e Etiologia	17
3.1.5 Tratamento	23
3.2 Óxido Nítrico.....	24
3.2.1 Mecanismo de Ação	26
3.2.2 O Óxido Nítrico e a Pele	26
4. Métodos	37
4.1 Seleção da Amostra	38
4.1.1 Estratificação da Amostra	38
4.1.2 Grupo Controle	39
4.2 Avaliação Histopatológica	40
4.3 Imunoistoquímica	41
4.3.1 Demonstração das Células Dendríticas CD1a+ (Langerhans) ..	42
4.3.2 Demonstração das Células Dendríticas FXIIIa+	43
4.3.3 Demonstração da Expressão de iNOS	44
4.3.4 Demonstração da Expressão de TNF alfa	45
4.3.5 Demonstração da Expressão de IL-10, IL-12 e IFN gama	46

4.4	Análise Morfométrica.....	47
4.4.1	Análise da expressão epidérmica de iNOS e das populações de células dendríticas	47
4.4.2	Análise da Expressão dérmica de iNOS, IL-10, IL-12 ,TNF alfa e IFN gama	48
4.4.3	Análise da Expressão das Citocinas analisadas na Epiderme ..	49
4.5	Análise Estatística	49
4.6	Ética	51
5.	Resultados.....	52
5.1	Caracterização da Amostra	53
5.1.1	Dados Clínicos.....	53
5.1.2	Dados Histopatológicos	58
5.1.3	Células Dendríticas Epidérmicas (CD1a+)	62
5.1.4	Células Dendríticas Dérmicas (FXIIIa+).....	64
5.1.5	Expressão de iNOS	66
5.1.6	Expressão de TNF alfa	72
5.1.6.1	Expressão de TNF alfa na Epiderme	72
5.1.6.2	Expressão de TNF alfa na Derme	73
5.1.7	Expressão de IFN gama	74
5.1.7.1	Expressão de IFN gama na Epiderme	74
5.1.7.2	Expressão de IFN gama na Derme	75
5.1.8	Expressão de IL-12.....	77
5.1.8.1	Expressão de IL-12 na Epiderme	77
5.1.8.2	Expressão de IL-12 na Derme	78
5.1.9	Expressão de IL-10.....	79
5.1.9.1	Expressão de IL-10 na Epiderme	79
5.1.9.2	Expressão de IL-10 na Derme	80
6.	Discussão	82
7.	Conclusão.....	99
8.	Anexos	102
9.	Referências.....	111

Lista de Abreviaturas

APC	Célula apresentadora de antígeno
Apud	Junto à (preposição latina-citação indireta)
Bax	Proteína Bax
Bcl2	Proteína Bcl2
CD1a	“Cluster Differentiation” 1a
CD3	“Cluster Differentiation” 3
CD4	“Cluster Differentiation” 4
CD7	“Cluster Differentiation” 7
CD8	“Cluster Differentiation” 8
CD25	“Cluster Differentiation” 25
CD29	“Cluster Differentiation” 29
CD62L	Selectina L
cél.	célula
CL	Célula de Langerhans
CLA	“Cutaneous Lymphocyte-associated antigen”
CMV	Citomegalovirus
cp	Campo microscópico
DMHF	Doença de Mucha-Habermann forma febril ulcero-necrótica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBV	Vírus Epstein-Barr
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
et.al.	e colaboradores
FA	Fração de área
FXIIIa	Fator XIIIa
GMPc	Guanil ciclase monofosfato cíclico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNOO ⁻	Peroxinitrito
HSP 70	Proteína de choque térmico 70
IgM	Imunoglobulinas M

IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF	Interferon
iNOS	Forma induzida da oxido nítrico sintase
IQH	Imunoistoquímica
ISH	Hibridização “in situ”
LCCT	Linfoma cutâneo de células T
LPS	Lipopolissacáride
LT	Linfócito T
m	média aritmética
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MxA	Proteína de resistência ao myxovirus
NET	necrólise epidérmica tóxica
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintase neural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PL	Pitíriase liquenóide
PLA	Pitíriase liquenóide aguda
PLC	Pitíriase liquenóide crônica
PLEVA	Pitíriase liquenóide e variceliforme aguda
p53	Proteína p53
RNS	espécimes reativas de nitrogênio
ROS	espécimes reativas de oxigênio
S-NO	S-Nitrosotiol
SSJ	Síndrome de Stevens-Johnson
Ta	Linfócito T ativado

TCR	Receptor de superfície do linfócito T
Th	Linfócito T auxiliar
Ti	Linfócito T inativo
TIA-1	Proteína citotóxica de linfócitos TIA-1
TLR	Receptor do tipo "Toll"
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Raios ultravioleta
UVA	Raios ultravioleta A
UVB	Raios ultravioleta B
VHC	Vírus da Hepatite C
VVZ	Vírus varicela-zoster

Lista de Símbolos

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μm	micrômetro
$\leq$	menor ou igual
$\leq$	menor ou igual
px	pixel
%	porcentagem
χ^2	Qui-quadrado
n	tamanho da amostra

Lista de Figuras

Figura 1 - Teoria dos superantígenos: Possível mecanismo responsável pela indução de lesões cutâneas na pitíriase liquenóide aguda.....	19
Figura 2 - Efeitos pró e anti - apoptóticos do óxido nítrico.....	28
Figura 3 - Produção de óxido nítrico após radiação ultravioleta.....	29
Figura 4 - Mecanismos antivirais do óxido nítrico	32
Figura 5 - Efeitos regulatórios do óxido nítrico sobre a proliferação de linfócitos T	34
Figura 7 - Pitíriase liquenóide aguda (doente correspondente ao caso sete).....	53
Figura 8 - Pitíriase liquenóide crônica (doente correspondente ao caso 11).....	53
Figura 9 - Pitíriase liquenóide aguda.....	58
Figura 10 - Pitíriase liquenóide crônica.....	59
Figura 11 - Células dendríticas CD1a+ epidérmicas em lesões de pitíriase liquenóide aguda e crônica.....	62
Figura 12 - Distribuição de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ em lesão de pitíriase liquenóide crônica.....	64

Figura 13 - Expressão de iNOS na epiderme de lesões de pitíriase liquenóide crônica.....	67
Figura 14 - Expressão de iNOS na derme em lesões de pitíriase liquenóide aguda e crônica.....	68
Figure 15 - Expressão de iNOS na epiderme e derme nos controles de pele normal e na reação com omissão do anticorpo primário.....	69
Figura 16 - Expressão de TNF alfa na pitíriase liquenóide crônica e aguda.....	73
Figura 17 - Expressão de IFN gama na pitíriase liquenóide crônica.....	74
Figura 18 - Expressão de IL-12 em lesões de pitíriase liquenóide crônica.....	77
Figura 19 - Expressão de IL-10 em lesões de pitíriase liquenóide crônica.....	79

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Resumo dos estudos relatando a associação da pitíriase liquenóide com diferentes agentes infecciosos.....103
- Tabela 2** - Resumo dos estudos relatando a detecção de clonalidade no rearranjo dos genes do TCR em lesões de pitíriase liquenóide104
- Tabela 3** - Subclassificação clínica e histopatológica das formas aguda e crônica da doença e avaliação de dados clínicos e das alterações histopatológicas nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide105
- Tabela 4** - Avaliação do número de linfócitos intra-epidérmicos e análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas da epiderme e derme nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide106
- Tabela 5** - Diagnóstico histopatológico e avaliação quantitativa das células dendríticas cutâneas, expressão epidérmica e dérmica de iNOS e dérmica do fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e das interleucina 10 e 12 nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide.....108
- Tabela 6** - Diagnóstico histopatológico e avaliação semi-quantitativa da expressão das interleucina 10 e 12, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa na epiderme nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide.....109

Lista de Anexos

Anexo A: Tabela 1 - Resumo dos estudos relatando a associação da pitíriase liquenóide com diferentes agentes infecciosos	103
Anexo B: Tabela 2 - Resumo dos estudos relatando a detecção de clonalidade no rearranjo dos genes do TCR em lesões de pitíriase liquenóide	104
Anexo C: Tabela 3 - Subclassificação clínica e histopatológica das formas aguda e crônica da doença e avaliação de dados clínicos e das alterações histopatológicas nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide	105
Anexo D: Tabela 4 - Avaliação do número de linfócitos intra-epidérmicos e análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas da epiderme e derme nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide	106
Anexo E: Figura 6 - Metodologia computacional utilizada na determinação da fração de área (FA)	107
Anexo F: Tabela 5 - Diagnóstico histopatológico e avaliação quantitativa das células dendríticas cutâneas, expressão epidérmica e dérmica de iNOS e dérmica do fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e das interleucina 10 e 12 nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide	108
Anexo G: Tabela 6 - Diagnóstico histopatológico e avaliação semi-quantitativa da expressão das interleucina 10 e 12, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa na epiderme nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide	109
Anexo H: Aprovação pelo comitê de Ética e Pesquisa	110

Resumo

Di Giunta G. *Células dendríticas, expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase e padrão de citocinas nas lesões de pitiríase liquenóide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 124p.

INTRODUÇÃO: A Pitiríase liquenóide (PL) é doença cutânea de etiologia desconhecida. Foi recentemente classificada no grupo das discrasias linfóides de células T. Excetuando-se os estudos sobre as características fenotípicas e moleculares dos linfócitos T na PL, trabalhos relativos aos demais componentes da resposta tecidual cutânea nesta doença são escassos. **MÉTODOS:** Biopsias de 34 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de PL foram classificadas de acordo com características histopatológicas nos grupos de pitiríase liquenóide aguda (PLA) (n = 15) e crônica (PLC) (n = 19), e submetidas a técnica imunoistoquímica para demonstração de células de Langerhans, dendrócitos dérmicos fator XIIIa+, expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interferon gama (IFN γ) e interleucinas (IL) 12 e 10. Fez-se a comparação dos resultados obtidos entre os grupos de PLA e PLC. A expressão de iNOS foi também comparada com grupo controle de pele normal (n = 10). **RESULTADOS:** A população de células de Langerhans epidérmicas foi menor no grupo de PLA. O número de dendrócitos dérmicos fator XIIIa+ não diferiu entre os grupos. Foi observada expressão epidérmica e dérmica de iNOS em ambos os grupos de PL. Três espécimes do grupo controle de pele normal apresentaram fraca expressão de iNOS epidérmica e dérmica. O grupo de lesões de PLA mostrou maior expressão dérmica de TNF α e IFN γ . A depleção de células de Langerhans epidérmicas foi acompanhada de maior expressão epidérmica de TNF α e IL-10. Houve correlação entre a expressão de iNOS e a população de dendrócitos dérmicos fator XIIIa+. **CONCLUSÕES:** Na PLA a população de células de Langerhans é menor que na PLC e se correlacionou com maior expressão epidérmica de TNF α e IL-10. Não houve diferenças na população de dendrócitos dérmicos fator XIIIa+ nos dois grupos de lesão. Demonstrou-se, pela primeira vez, expressão epidérmica e dérmica de iNOS nas lesões de PL. A expressão de iNOS dérmica correlacionou-se com a população dendrocítica Fator XIIIa+. Houve correlação entre a expressão de TNF α e de IFN γ com as alterações inflamatórias da PLA. Houve correlação negativa entre a expressão dérmica de IL-12 e IL-10 nas lesões da PL. No espectro da resposta tecidual da PL participam as células dendríticas da pele, em ambiente de padrão imunológico Th1 predominante, com conseqüente indução da expressão de iNOS nos sítios de lesão.

Summary

Di Giunta G. *Dendritic cells, inducible nitric oxide synthase and cytokines expression in pityriasis lichenoides skin lesions* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 124p.

BACKGROUND: Pityriasis lichenoides (PL) is a cutaneous disease of unknown etiology which has been regarded as an immunologically mediated reaction. Recently, it was reclassified in the group of Cutaneous Lymphoid T cell Dyscrasia. There are few reports addressing mainly T cell subsets in PL tissue reaction. **METHODS:** Skin biopsies taken from 34 patients with confirmed diagnosis of PL were classified as pityriasis lichenoides et varioliformis acuta (PLEVA) (n = 15) and pityriasis lichenoides chronica (PLC) (n = 19) according to histopathological features. The skin biopsies were subjected to immunohistochemical technique to demonstrate Langerhans cells, Factor XIIIa+ dermal dendrocytes, inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (IFN γ) and interleukins (IL) 12 and 10. The ensuing results were compared among the two PL groups. The iNOS results in PL group were also compared to a normal skin control group (n = 10). **RESULTS:** In PLEVA lesions, there was a decrease in Langerhans cells population when compared to PLC lesions. The factor XIIIa+ dermal dendrocytes number did not differ among PL groups. There was a strong epidermal and dermal iNOS expression in both PL groups. A faint iNOS expression was observed in three specimens of the control group. A higher TNF α and IFN γ expression was observed in PLEVA lesions. The Langerhans cells decrease observed in those lesions was accompanied by higher TNF α and IL-10 expression. There was a significant correlation between factor XIIIa+ dermal dendrocytes population and dermal iNOS expression. **CONCLUSIONS:** PLEVA lesions displayed a decrease in Langerhans cells number, accompanied by higher TNF α and IL-10 expression. There was no difference in the amount of factor XIIIa+ dermal dendrocytes in PLEVA and PLC lesions. The study demonstrated, for the first time, the iNOS expression in PL lesions. The factor XIIIa+ dermal dendrocytes population correlated to dermal iNOS expression. TNF α and IFN γ expression correlated to inflammatory alterations observed in PLEVA lesions. There was a negative correlation between IL-12 and IL-10 expression in PL lesions. Dendritic cells participate in the PL spectrum of tissue reaction which is characterized by predominant TH1 cytokines milieu that favors iNOS expression.

1. Introdução

A Pitiríase liquenóide é uma doença inflamatória cutânea de etiologia desconhecida. Duas variantes clínico-patológicas espectrais têm sido descritas, uma forma aguda, caracterizada como pitiríase liquenóide e variceliforme aguda (PLA) ou doença de Mucha-Habermann, e uma forma crônica, denominada pitiríase liquenóide crônica (PLC). A forma aguda (PLEVA) incide principalmente nas duas primeiras décadas de vida, caracterizada clinicamente pela presença de lesões polimórficas, com pápulas eritematosas evoluindo para vesículas hemáticas, ulceração e necrose, sendo geralmente autolimitada, cursando ao longo de várias semanas. A forma crônica (PLC) acomete pacientes mais velhos, sendo caracterizada por erupção monomórfica liquenóide pápulo-descamativa muitas vezes evoluindo para lesões cicatriciais hipocrômicas, neste caso as lesões podem persistir por meses ou anos. Ambas as formas exibem uma tendência a episódios de recrudescimento (Ersoy-Evans et al., 2007). Uma terceira forma foi descrita por Degos em 1966, denominada doença de Mucha-Habermann febril (DMHF), sendo classificada como um subtipo úlcero-necrótico da PLA, associada à presença de hipertermia e com curso clínico muitas vezes fatal (Degos et al., 1966). Apesar da separação em subtipos, a maioria dos autores acredita em uma única doença espectral com lesões de ambas as formas clínicas podendo ser encontradas em um mesmo paciente (Black e Marks, 1972; Romani et al., 1998; Shieh et al., 2001; Tomasini et al., 2004).

As lesões de PL caracterizam-se, ao exame histopatológico, por variável intensidade de alterações epidérmicas representadas por degeneração vacuolar dos queratinócitos basais, espongiose e exocitose de linfócitos e hemácias, paraqueratose focal, e apoptose de queratinócitos. As alterações dérmicas constituem-se por infiltrado inflamatório, predominantemente superficial, composto por linfócitos e hemácias extravasadas. Os critérios histopatológicos para a diferenciação entre as formas espectrais, e que favorecem o diagnóstico da forma aguda da doença, são a presença de queratinócitos apoptóticos, ausência e/ou adelgaçamento importante da camada granulosa, presença de envolvimento do plexo vascular profundo e infiltrado inflamatório em forma de “cunha” (Romani et al., 1998). Apesar da utilização desses critérios, em muitos casos não há correspondência clínico-patológica em relação ao diagnóstico do subtipo da PL (Tomasini et al., 2004).

O infiltrado inflamatório na PL é composto principalmente por linfócitos T, com células T CD8+, predominando na PLA (Muhlbauer et al., 1984), e linfócitos T CD4+ na PLC (Shieh et al., 2001). Estudos posteriores, com um maior número de casos e metodologia mais rigorosa sugerem, entretanto, a presença de um mecanismo citotóxico em ambas as formas da doença. Essa hipótese considera que, como evento primário, ocorra uma perturbação da homeostase dos queratinócitos, provavelmente em resposta a um patógeno, com subsequente ativação de células T citotóxicas efectoras (Tomasini et al., 2004).

Apesar do grande número de trabalhos publicados sobre a doença, a verdadeira natureza da PL ainda é desconhecida. Estudos recentes têm relatado com variável frequência a presença de rearranjo monoclonal dos genes do receptor de células T (TCR) (Dereure et al., 2000; Shieh et al., 2001; Magro et al., 2002; Weinberg et al., 2002) em ambas as formas de PL. Esses achados, associados a presença de um evento desencadeante desconhecido, ao curso clínico crônico e recalcitrante, além da possibilidade de evolução da lesão para linfoma cutâneo de células T (CTCL), justificam a inclusão da PL no recém concebido grupo das Discrasias Linfóides de células T (Guitart e Magro, 2007). Todavia, raros são os relatos de progressão de PL para linfoma cutâneo de células T (Fortson et al., 1990; Thomson et al., 1999). Estudos recentes, com casuística expressiva e longo tempo de acompanhamento de pacientes com PL, não demonstraram nenhum caso de evolução para CTCL (Gelmetti et al., 1990; Ersoy-Evans et al., 2007; Wahie et al., 2007).

Em contrapartida, outros autores consideram a PL como processo reativo benigno, possivelmente secundário à resposta imune anormal frente a diferentes microorganismos. Algumas características como o agrupamento de casos em determinadas épocas do ano, incidência familiar, a presença de títulos sorológicos elevados para determinados agentes infecciosos e a melhora das lesões com tratamento patógeno-específico, corroboram com esta teoria (Dupont, 1995; Klein et al., 2003; Ersoy-Evans et al., 2007). Por outro lado, a maior parte destes estudos é limitada, por tratar-se de relatos de casos isolados com detecção da suposta infecção por técnicas sorológicas e moleculares, na vigência da erupção cutânea.

1.1 Resposta imune cutânea na Pitiríase liquenóide

Excetuando-se os estudos sobre as características fenotípicas e moleculares dos linfócitos T na PL, trabalhos relativos aos demais componentes da resposta tecidual cutânea nesta doença são escassos. Alguns autores demonstraram a expressão de HLA-DR nos linfócitos T do infiltrado dérmico, ductos écrinos e endotélio vascular nas lesões de PLA (Muhlbauer et al., 1984) e nos queratinócitos em ambas as formas da doença (Smith et al., 1997; Shieh et al., 2001), sugerindo uma possível relação com as lesões cutâneas mediadas pelo interferon gama (IFN gama) (Smith et al., 1997). Muhlbauer et al., (1984) relatam uma depleção de células de Langerhans no centro das lesões de PLA, relacionando este achado à migração destas células para os linfonodos ou a morte das mesmas. Além disso, outro estudo demonstra um aumento considerável nos níveis do fator de necrose tumoral alfa no sangue periférico de um paciente com PLA durante a evolução para a forma úlcero-necrótica (Tsianakas e Hoeger, 2005). A PL é uma doença inflamatória cutânea de caráter persistente e etiologia desconhecida. Recentemente foi considerada como processo de discrasia de linfócitos T nas lesões. Entretanto, poucos trabalhos envolvem o estudo dos elementos celulares da imunidade inata e perfil de citocinas nas lesões da PL.

1.2 Óxido nítrico

A participação do óxido nítrico (NO) em diversos processos fisiológicos e patológicos tem sido intensamente abordada. O óxido nítrico (NO) é um radical altamente reativo, produzido a partir do aminoácido L-arginina através da reação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas foram descritas, sendo que a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS- NOS1) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS- NOS3) são expressas de forma constitutiva. A terceira isoforma é a forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS-NOS2), sendo transcrita somente frente a estímulos imunológicos de citocinas ou a ligação de padrões moleculares patógeno – associados (PAMPs) como os lipopolissacarídeos (LPS) da parede bacteriana .

O NO é uma molécula que age como mensageiro, tanto de maneira autócrina como parácrina estando relacionado a eventos fisiológicos e atuando como um importante mediador de respostas patológicas na pele (Bruch-Gerharz et al., 1998a; Cals-Grierson e Ormerod, 2004). Nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm demonstrado o papel fundamental e pleiotrópico do NO na indução e desenvolvimento de diversos padrões de resposta imune cutânea, como os estados hiperproliferativos (Bruch-Gerharz et al., 2003), doenças granulomatosas (Schon et al., 2001; Qadoumi et al., 2002) doenças auto-imunes (Kuhn et al., 1998; Tsukazaki et al., 2002) processo de cicatrização de feridas (Lee et al., 2001) e na melanogênese (Romero-Graillet et al., 1997). Além disso, estímulos externos como radiação

ultravioleta (UV) (Kuhn et al., 1998; Tsukazaki et al., 2002) e a presença de agentes infecciosos (Schon et al., 2001; Weller et al., 2001; Lim et al., 2002; Qadoumi et al., 2002; Diaz et al., 2006) parecem ativar a resposta cutânea mediada pelo NO.

Em virtude da labilidade da molécula de NO, a identificação de suas três isoformas tem sido utilizada com o intuito de elucidar o papel deste mensageiro em diferentes mecanismos celulares. A expressão da isoforma induzida (iNOS) na pele foi demonstrada nos queratinócitos, células de Langerhans, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (Kuhn et al., 1998; Schon et al., 2001; Lim et al., 2002; Qadoumi et al., 2002; Tsukazaki et al., 2002; Bruch-Gerharz et al., 2003).

Este estudo objetivou avaliar quantitativamente a população de células dendríticas da pele, a expressão de iNOS e de citocinas pró e anti-inflamatórias nas lesões das formas aguda e crônica da pitíriase liquenóide, sendo que a expressão da iNOS foi analisada e comparada também com controles provenientes de biópsias de pele de indivíduos saudáveis.

2. Objetivos

Com o objetivo de contribuir para o entendimento da fisiopatologia bem como da resposta tecidual na pitiríase liquenóide, pretendemos:

1. Demonstrar e comparar a população de células de Langerhans nas lesões com características histopatológicas da pitiríase liquenóide aguda e da pitiríase liquenóide crônica.
2. Demonstrar e comparar a população de células dendríticas dérmicas Fator XIIIa positivas nas lesões com características histopatológicas da pitiríase liquenóide aguda e da pitiríase liquenóide crônica.
3. Demonstrar e comparar a expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS) nas lesões com características histopatológicas da pitiríase liquenóide aguda, da pitiríase liquenóide crônica e no grupo controle de pele normal.
4. Demonstrar e comparar a expressão de interleucinas pró-inflamatórias (Interleucina 12, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa) e reguladora (interleucina 10), nas lesões com características histopatológicas da pitiríase liquenóide aguda e da pitiríase liquenóide crônica.

5. Verificar a existência de correlação entre população de células dendríticas, expressão de iNOS e interleucinas nas lesões com características histopatológicas da pitíriase liquenóide aguda e da pitíriase liquenóide crônica.

3. Revisão da literatura

3.1 Histórico

A Pitiríase liquenóide (PL), foi descrita simultaneamente por Neisser e Jadassohn em 1894, (Jadassohn, 1984; Neisser, 1984) os quais descreveram, respectivamente, um caso do que hoje consideramos a forma aguda e crônica da doença. Em 1899, Juliusberg descreveu a forma crônica da doença utilizando pela primeira vez o termo Pitiríase liquenóide crônica (PLC) (Juliusberg, 1899). A PL foi incluída no grupo das parapsoríases, como uma forma em gotas, por Brocq em 1902 (Brocq, 1902). Esta classificação foi utilizada até o ano de 1926, quando a PL foi então considerada como uma entidade distinta da parapsoríase. Mucha (1916) identificou, pela primeira vez, a forma aguda da doença, sendo denominada Pitiríase liquenóide e variceliforme aguda (PLEVA) por Habermann (1925). Tendo em vista a contribuição dos dois autores para a descrição desta forma da doença ela também é conhecida como doença de Mucha-Habermann (Mucha, 1916; Habermann, 1925). Degos et al. (1966) descrevem uma terceira forma da PL, caracterizada pela presença de lesões úlcero-necróticas, hipertermia e curso clínico muitas vezes fatal. Esta variante clínica foi então denominada Doença de Mucha-Habermann Febril úlcero-necrótica (DMHF).

3.1.1 Epidemiologia

A incidência e a prevalência da PL não são conhecidas. Alguns autores estimaram a incidência da doença em torno de um caso a cada 2000 pessoas (Daoud e Pittelkow, 2003). Não há referências acerca de predisposição geográfica, étnica ou fatores de risco para a doença (Bowers e Warshaw, 2006). Alguns autores demonstram um maior número de casos de PL nos meses de inverno (Ersoy-Evans et al., 2007). A incidência da doença é maior entre pré-adolescentes e adultos jovens. Apesar de alguns estudos apontarem para uma discreta predominância no sexo masculino (Khachemoune e Blyumin, 2007), revisões com casuísticas maiores demonstram não haver predominância em relação ao sexo (Magro et al., 2002; Ersoy-Evans et al., 2007). Foram relatados raros casos de PL durante a gestação (Brazzini et al., 2001).

3.1.2 Quadro Clínico

A PLA é caracterizada clinicamente por lesões polimórficas, com pápulas eritematosas que evoluem para vesículas hemáticas, ulceração e necrose. A PLA geralmente é autolimitada, com curso clínico prolongado, podendo se estender por várias semanas. (Marks e Black, 1972; Tomasini et al., 2004). Em contrapartida, a PLC exibe erupção monomórfica, liquenóide, pápulo-descamativa, curso clínico mais arrastado com persistência das lesões por meses ou anos (Romani et al., 1998; Ersoy-Evans et al., 2007).

Ambas as formas de PL exibem tendência a episódios de recrudescimento com altas taxas de recorrência principalmente no grupo pediátrico (Ersoy-Evans et al., 2007; Wahie et al., 2007).

Tanto as lesões da forma aguda quanto as da forma crônica da PL podem cursar com alterações pigmentares residuais, geralmente máculas hipocrômicas (Ersoy-Evans et al., 2007). As lesões se distribuem principalmente na face anterior do tronco, e flexora do segmento proximal dos membros (Romani et al., 1998). Prurido leve a intenso é descrito pela maioria dos autores em até 59% dos casos (Ersoy-Evans et al., 2007). Sintomas sistêmicos leves como mialgia, cefaléia, artralgia, febre baixa e linfadenopatia, podem acompanhar a erupção cutânea na forma aguda da doença (Romani et al., 1998; Ersoy-Evans et al., 2007). Lesões necróticas, ulceradas, acompanhadas de febre alta associada à leucocitose, com comprometimento de mucosas, caracterizam a forma ulcero-necrótica descrita por Degos (Degos et al., 1966).

Clinicamente podem coexistir ou aparecerem durante a evolução do quadro, em um mesmo paciente, lesões com características próprias das formas aguda e crônica da PL, muitas vezes com dissociação clínico-patológica (Tomasini et al., 2004). Estes achados reforçam a teoria de uma doença única com formas clínicas espectrais (Black e Marks, 1972; Romani et al., 1998; Shieh et al., 2001; Tomasini et al., 2004; Magro et al., 2007).

3.1.3 Histopatologia

Szymanski (1959) faz, pela primeira vez, uma minuciosa descrição das características histopatológicas da PL com o objetivo de separá-la histologicamente do grupo das parapsoríases. O autor descreve a PLA essencialmente como uma vasculite, com comprometimento epidérmico secundário. Nos estágios iniciais da doença (evolução de 24 horas) os achados histológicos assemelham-se aos observados no eritema tóxico, com as alterações limitadas aos capilares superficiais exibindo discreto extravasamento de hemácias e infiltrado perivascular linfocitário (Szymanski, 1959).

Nas fases posteriores da doença, observa-se o início do processo descamativo associado com a presença de pápulas e vesículas, destacando-se o comprometimento epidérmico progressivamente mais exuberante. As alterações epidérmicas são representadas por paraqueratose focal, acantose e edema intercelular discretos, associadas a infiltrado linfocitário perivascular de linfócitos, tumefação endotelial e extravasamento de hemácias. O processo é acompanhado da perda completa da arquitetura normal da epiderme, que é permeada por intenso infiltrado de células inflamatórias e hemácias. Estas alterações estão associadas a um infiltrado inflamatório dérmico exuberante e alterações vasculares comparáveis às observadas na sífilis, entretanto, sem plasmócitos. (Szymanski, 1959)

Na PLC, as alterações microscópicas são pronunciadamente mais sutis. A epiderme exibe acantose discreta a moderada, paraqueratose focal, espongiose com exocitose, por vezes com formação de vesículas intra-epiteliais. Na derme, os vasos sangüíneos superficiais mostram-se ectásicos, congestos e envoltos por infiltrado perivascular com predomínio de linfócitos. A presença de alterações vasculares com diapedese de hemácias é um achado constante tanto nas fases aguda quanto crônica da doença (Szymanski, 1959).

Em 1982 Ackerman definiu critérios histopatológicos para distinguir a PLA da PLC. O grau de necrose de queratinócitos, extravasamento de hemácias, densidade do infiltrado linfóide e envolvimento do plexo vascular dérmico profundo foram definidos como parâmetros para distinção das formas aguda e crônica da PL (Ackerman, 1982).

Romani et al. (1998), ao estudar o quadro clínico e histopatológico de um grupo de 22 crianças com diagnóstico de PL, definem, a partir dos critérios propostos anteriormente por Ackerman, as alterações morfológicas mais significativas na discriminação histopatológica entre as formas aguda e crônica da doença. Segundo os autores, a PLA caracteriza-se pela presença de necrose de queratinócitos, adelgaçamento ou desaparecimento da camada granulosa, presença de infiltrado inflamatório envolvendo o plexo vascular dérmico profundo e infiltrado em forma de “cunha”. Sendo que, o extravasamento de hemácias em conjunto com infiltrado inflamatório de padrão liquenóide se mostram como os critérios menos específicos na distinção entre as duas formas da doença. (Romani et al., 1998).

Estudos imunofenotípicos demonstraram que o infiltrado inflamatório na PL é constituído principalmente por linfócitos T, com predomínio de células CD8+ citotóxicas CLA+ (Cutaneous Lymphocyte-associated antigen) (Tomasini et al., 2004), sendo estas predominantes na resposta tecidual da PLA (Muhlbauer et al., 1984; Tomasini et al., 2004). Na PLC, a maior parte dos linfócitos exibe positividade para o CD4 (CD4+) e são negativos para o CD25 (CD25-) (Shieh et al., 2001).

3.1.4 Fisiopatologia e Etiologia

Em 1972, Black e Marks descrevem o papel do componente epidérmico, do infiltrado inflamatório dérmico e dos capilares superficiais na patogênese da PL. Os autores sugerem a existência de uma substância vasoativa liberada em altas concentrações levando à vasodilatação e hemorragia na derme papilar. A lesão da epiderme seria secundária a “invasão” por células inflamatórias (Marks e Black, 1972).

Depósitos imunes de imunoglobulina G (IgG) e da fração C3 do sistema complemento foram demonstrados na parede dos vasos sangüíneos da derme superficial e na junção dermo-epidérmica nas lesões de PL, assim como imunocomplexos circulantes. Com base nestes achados, Clayton e Haffenden propõem a PL como uma doença secundária à ação de complexos imunes (Clayton e Haffenden, 1978). Entretanto, estas observações não puderam ser validadas ou foram subvalorizadas em estudos posteriores (Muhlbauer et al., 1984).

Muhlbauer et al. (1984) consideram ser o componente citotóxico de células T CD8+, o responsável pelas alterações epidérmicas e vasculares na

PLA. Os autores demonstram existir uma depleção de células de Langerhans nas lesões cutâneas associado a uma redução da relação entre linfócitos T CD4+/ T CD8+ no sangue periférico dos doentes portadores da forma aguda da doença. Estes achados reforçariam a idéia de um evento citotóxico secundário à apresentação antigênica por queratinócitos e/ou células de Langerhans.

Excetuando-se os estudos sobre as características fenotípicas e moleculares dos linfócitos T na PL, trabalhos relativos aos demais componentes da resposta tecidual cutânea nesta doença são escassos. Na PLA os linfócitos T, os ductos sudoríparos écrinos e as células endoteliais expressam HLA-DR (Muhlbauer et al., 1984). Além disso, queratinócitos tanto nas lesões de PLA como na PL, também expressam esse antígeno (Muhlbauer et al., 1984; Smith et al., 1997; Shieh et al., 2001). Este padrão de expressão de HLA-DR pelos queratinócitos está, em geral, relacionado com erupções cutâneas mediadas pelo IFN gama (Smith et al., 1997).

Smith et al., (1997) demonstram, em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), uma associação entre a presença de células T ativadas (CD29+) na epiderme, a expressão de HLA-DR+ nos queratinócitos e a presença de queratinócitos apoptóticos nas lesões de PLA. Este padrão imunofenotípico, foi observado nas fases iniciais e/ou intermediária da doença, onde predomina o padrão de citocinas Th1. Os autores propõem a teoria de que os queratinócitos HLA-DR+ seriam capazes de apresentar superantígenos diretamente às células T que expressam TCR β específicos (Figura 1). Em alguns casos, a exposição repetida a estes superantígenos levaria à anergia e/ou deleção clonal, o que poderia estar relacionado à melhora da erupção cutânea (Smith et al., 1997).

TEORIA DOS SUPERANTÍGENOS: Possível mecanismo responsável pela indução de lesões cutâneas na PLEVA

Modificado de Smith et al., 1997

Figura 1 - Teoria dos Superantígenos. Os queratinócitos expressando HLA-DR, têm a capacidade de apresentar superantígenos diretamente a Linfócitos T não ativados (cél. Ti), após a apresentação estes clones de Linfócitos T, agora ativados (cél. Ta) expressando TCR β específicos, são eliminados por apoptose, tornam-se anérgicos ou podem proliferar fazendo reação cruzada com auto-antígenos dos queratinócitos induzindo estas células a apoptose.

Muhlbauer et al. (1994), estudando lesões de PLA, observam uma depleção relativa de células de Langerhans (CL) no centro das biopsias de lesões tardias. Em lesões precoces, as camadas superiores da epiderme na mesma região (centro das biopsias) mostram um aumento relativo desta população em relação às camadas inferiores da epiderme.

Em 2004, Tsianakas e Hoeger, no seguimento clínico de uma criança com PLA, demonstram que a evolução para a forma úlcero-necrótica foi acompanhada de um aumento significativo nos níveis séricos de TNF alfa. Este aumento foi proporcional à intensa necrose de queratinócitos e ao influxo maciço de células inflamatórias, característicos desta forma da doença. (Tsianakas e Hoeger, 2005).

As publicações referentes à fisiopatologia da PL se concentram em duas proposições fisiopatológicas as quais, nos últimos anos, têm se sobreposto na tentativa de um melhor entendimento da doença. A primeira considera a PL como uma resposta imune anormal, provavelmente secundária a um agente infeccioso (Muhlbauer et al., 1984; Dupont, 1995; Tomasini et al., 2004). Em contrapartida, há evidências contundentes que justificam a classificação da PL no grupo das discrasias linfóides de células T (Guitart e Magro, 2007).

Entre as características clínicas e epidemiológicas que sugerem a relação da PL com um provável agente infeccioso destacam-se o início da doença em idade precoce, a presença de uma fase aguda eruptiva, ocorrência de casos familiares, o agrupamento de casos em determinadas

épocas do ano, o aumento de títulos sorológicos para diferentes patógenos na vigência da erupção cutânea e a melhora do quadro clínico após a supressão de agentes infecciosos (Takahashi e Atsumi, 1993; Dupont, 1995). Além disso, o aumento de linfócitos T CD8+ e diminuição de células T CD4+ circulantes, observado em alguns casos de PLA, sugerem a possibilidade de uma infecção viral (Muhlbauer et al., 1984).

A associação da PL com diversos agentes infecciosos têm sido demonstrada em geral, em estudos com um número de casos pouco expressivo ou relatos de casos isolados, através da demonstração de títulos sorológicos de imunoglobulinas M (IgM) específicas, e/ou do isolamento de patógenos através de técnicas de biologia molecular (Tomasini et al., 2004).

Há relatos de PL associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Smith et al., 1997); *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A (Takahashi e Atsumi, 1993; English et al., 1995); *Toxoplasma gondii* (Rongioletti et al., 1999); citomegalovírus (CMV) (Tsai et al., 2001); vírus Epstein–Barr (EBV) (Klein et al., 2003); vírus da Varicela-Zoster (VVZ) (Boralevi et al., 2003); parvovírus B19 (Tomasini et al., 2004) e vírus da hepatite C (VHC) (Zechini et al., 2005) (Anexo A, Tabela 1).

A partir do ano de 2000, com a demonstração de clonalidade de linfócitos T nas lesões de PLA (Dereure et al., 2000), a PL passa a ser considerada uma discrasia linfóide cutânea. Magro et al. (2002) demonstram um fenótipo de células T anormal, com perda da expressão de CD7 e da selectina CD62L nos linfócitos T presentes nas lesões de PL, à semelhança do que ocorre em alguns casos de micose fungóide.

Diversos autores, cujos estudos estão sumarizados no Anexo B, Tabela 2, demonstram, por técnicas moleculares distintas, mono e/ou oligoclonalidade do rearranjo dos genes γ e/ou β do TCR (Dereure et al., 2000; Shieh et al., 2001; Magro et al., 2002; Weinberg et al., 2002; Magro et al., 2007). A presença de população oligo ou monoclonal nos infiltrados linfóides tem sido considerada por muitos autores como marcadores de malignidade. Entretanto, população linfóide mono ou oligoclonal pode ser observada na vigência de condições benignas, como infecções virais (Islam et al., 2001), em pacientes idosos (Schwab et al., 1997) e em doenças auto-imunes (Oksenberg et al., 1993). Na PLA, os linfócitos mono ou oligoclonais são linfócitos T CD8+. Especula-se que seriam resultantes de uma resposta imune individual a determinados fatores patogênicos, em especial a um possível agente viral (Kadin, 2002).

Apesar da freqüente demonstração de monoclonalidade e/ou restrição clonal do gene do TCR pelos linfócitos T infiltrantes nas lesões de PL, são raros os relatos de progressão para linfoma cutâneo de células T (LCCT) (Fortson et al., 1990; Thomson et al., 1999). Estudos recentes, com casuística expressiva e longo tempo de seguimento de pacientes com PL, não observaram nenhum caso de evolução de PL para LCCT (Gelmetti et al., 1990; Ersoy-Evans et al., 2007; Wahie et al., 2007).

Linfócitos T CD8+ com fenótipo citotóxico (TIA-1+, granzima B+) e exibindo expressão da molécula associada ao “skin homing”, CLA+ (cutaneous lymphocyte antigen) e de MxA (proteína de resistência ao myxovirus), uma proteína antiviral e um marcador da expressão de

interferons do tipo I, mostram-se em quantidade e distribuição semelhantes em casos de PL, Linfoma T cutâneo citotóxico e nas lesões cutâneas causadas pela infecção pelo vírus varicela-zoster. Estas observações apontam para um possível evento inicial semelhante entre os diferentes processos patológicos (Wenzel et al., 2005).

Em recente publicação, Guitart e Magro (2007) defendem a criação do grupo das discrasias linfóides de células T, o qual compreenderia diferentes doenças cutâneas com características clínicas e fisiopatológicas comuns como: a presença de curso crônico caracterizado por recaídas após tratamento tópico; evento desencadeante desconhecido; ausência de evidências de estados de hipersensibilidade, alergia, doença do colágeno ou processos linfoproliferativos; ou de alterações cito - morfológicas francas de malignidade; presença de mono ou oligoclonalidade do infiltrado de linfócitos T e potencial de evolução para LCCT. A PL seria incluída neste grupo de processos, ao lado de outras condições como a dermatite de interface hipocromiante, púrpura pigmentosa, paniculite lobular linfocitária atípica, mucinose folicular idiopática e a parapsoríase. O termo discrasia foi utilizado com o intuito de caracterizar o desequilíbrio da resposta de linfócitos T a antígenos, ainda que desconhecidos, observado na PL e nas demais doenças cutâneas que compõem o grupo.

3.1.5 Tratamento

A literatura relata um grande número de estratégias terapêuticas utilizadas na PL. Séries pequenas de doentes exibindo respostas variáveis

demonstram melhora das lesões com tratamento antibiótico (eritromicina e tetraciclina) (Ersoy-Evans et al., 2007). Há relatos do uso de imunomoduladores tópicos e fototerapia com respostas inconstantes e recidivas após a interrupção do tratamento (Bowers e Warshaw, 2006). Recentemente, Pavlotsky e colaboradores reportam o uso de raios ultravioleta B (UVB) em 29 casos de PL obtendo 93,1% de respostas completas, com uma taxa de manutenção de 73% após acompanhamento médio de 36 a 58 meses (Pavlotsky et al., 2006).

3.2 Óxido Nítrico

A primeira descrição da ação do NO na pele foi feita por Heck et. al., (1992). A partir daí, numerosos trabalhos têm demonstrado uma variedade de funções deste mensageiro molecular, como sinalizador e regulador de reações fisiológicas e patológicas da pele. O NO é um importante mediador na resposta a uma variedade de estímulos nocivos externos como, por exemplo, à radiação ultravioleta (Kuhn et al., 1998; Tsukazaki et al., 2002). Esta molécula participa ainda dos mecanismos responsáveis pela imunidade inata e adaptativa contra patógenos (Bogdan, 2001; Weller et al., 2001; Qadoumi et al., 2002; Diaz et al., 2006), do processo de cicatrização de feridas (Lee et al., 2001) e da carcinogênese (Bruch-Gerharz et al., 1998a; Cals-Grierson e Ormerod, 2004).

A produção do NO na pele é realizada por diversos elementos celulares cutâneos através da síntese de proteínas com atividade enzimática, denominadas óxido nítrico sintases (NOS), as quais utilizam o aminoácido L-arginina como substrato. A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) fazem parte da família das sintases e são expressas constitutivamente. Estas duas isoformas estão mais associadas com os eventos fisiológicos, são dependentes de cálcio e liberam concentrações baixas, porém contínuas, de NO. A terceira isoforma, denominada de forma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS) é transcrita pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF alfa, IL-1 e IFN gama (Hanafy et al., 2001). A produção de iNOS é também induzida pela ligação de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) como lipopolissacárides (LPS) a um receptor do tipo Toll (TLR)(Kropf et al., 2004; Vazquez-Torres et al., 2004). A iNOS produz altos níveis de NO, independentemente da concentração de cálcio (Cals-Grierson e Ormerod, 2004; Vazquez-Torres et al., 2004). A transcrição da iNOS, pode ser inibida por glicocorticóides, doxifilina e retinóides (Bruch-Gerharz et al., 1998b).

A produção da forma induzida da enzima (iNOS) na pele foi demonstrada em queratinócitos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos (Schon et al., 2001; Giustizieri et al., 2002; Lim et al., 2002; Qadoumi et al., 2002; Diaz et al., 2006). Entretanto, uma outra via, não enzimática, pode produzir NO na superfície epidérmica a partir da redução de nitrito das glândulas sudoríparas sob a ação de bactérias comensais cutâneas (Weller et al., 1996).

3.2.1 Mecanismo de Ação

O NO é molécula simples e altamente difundível, solúvel tanto em meio aquoso como lipídico (Rowe et al., 1997). As funções do NO como mensageiro molecular ocorrem através de sua interação com grupos proteicos, metais de transição e/ou com outros radicais livres. Em baixas concentrações, como em situações fisiológicas, o NO interage com metais de transição, em especial com o ferro dos grupamentos heme, induzindo a produção de GMPc (guanil ciclase monofosfato cíclico) o que resulta na alteração da expressão de fatores de transcrição. Sob altas concentrações, o NO age através da produção de espécies reativas de nitrogênio, por exemplo, nitrato e peroxinitrito. Estas moléculas agem modificando proteínas que contém resíduos de cisteína (processo de nitrosilação), e tirosina (nitração). Sob certas circunstâncias, esta molécula causa ainda a desaminação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (Hanafy et al., 2001; Cals-Grierson e Ormerod, 2004).

3.2.2 O Óxido Nítrico e a Pele

3.2.2.1 Óxido Nítrico e Apoptose

O NO pode interferir no ciclo celular tanto induzindo como inibindo a apoptose (Figura 2) (Kim et al., 1999). Esta ação é dependente de fatores diversos como tipo celular, presença de outros radicais livres e níveis de concentração. Baixas concentrações de NO, como as induzidas pela ação

da radiação UV inibem a apoptose tanto de queratinócitos quanto de células dérmicas e do endotélio vascular. Este efeito parece ser mediado pelo GMPc (guanil ciclase monofosfato cíclico) e por inibição direta das caspases (Kroncke et al., 1998; Weller, 2003).

Em contrapartida, altas concentrações de NO, como aquelas produzidas pela ação da iNOS, estão associadas com predomínio do efeito pró-apoptótico desta molécula. Na necrólise epidérmica tóxica (NET) e na Síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) ocorre intensa expressão de iNOS nas camadas inferiores da epiderme e no infiltrado dérmico superficial, a qual se associa à presença de necrose e apoptose dos queratinócitos, características destas doenças (Lerner et al., 2000). Lim et al., relatam ainda intensa expressão de iNOS pelos queratinócitos apoptóticos das lesões cutâneas agudas de Herpes-zoster (Lim et al., 2002). Além disso, a aplicação tópica de NO (nitrito acidificado) na pele de indivíduos saudáveis, ocasiona efeitos citotóxicos com aumento significativo de p53 e apoptose de queratinócitos induzida por citocinas (Ormerod et al., 1999).

Efeitos pró e antiapoptóticos do NO

Modificado de Mannick, 2006

Figura 2 - Efeitos pró e antiapoptóticos do óxido nítrico (NO). **(A)** O NO estimula a apoptose através da inibição do NF-κB e aumento da atividade do p53 levando a superexpressão da proteína próapoptótica Bax, inibição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 e liberação do citocromo c da mitocôndria. **(B)** O NO inibe a apoptose através do aumento da expressão das proteínas Bcl2 e de choque térmico 70 (HSP 70), inibição da caspase 3 e estimulação da tioredoxina.

Na pele de pacientes com lupus eritematoso há um retardo relativo da produção de NO após estímulo com radiação ultravioleta (RUV). A expressão de iNOS, ocorre somente 72 horas após a fotoexposição. Na pele sã, a expressão máxima da iNOS é observada após 48 horas da exposição a RUV, com ausência de sua expressão em 72 horas. A produção inadequada de NO, secundária ao retardo na expressão de iNOS, após a agressão pela radiação UV levaria à perda do efeito protetor do NO e conseqüente indução

da apoptose de queratinócitos, com liberação de DNA e aumento da produção de auto-anticorpos, característicos do lúpus eritematoso. Este retardo na produção do NO seria responsável pela fotossensibilidade observada nestes pacientes (Kuhn et al., 1998) (Figura 3).

Produção de óxido nítrico (NO) após radiação ultravioleta (RUV)

Figura 3 - Efeitos do NO após a radiação ultravioleta. **(A)** Efeitos protetores do NO nos queratinócitos, endotélio e células da derme através da inibição da apoptose. **(B)** Retardo da produção de NO após a radiação ultravioleta em pacientes com lúpus eritematoso. Perda do efeito protetor do NO, ativando a apoptose e liberando DNA com aumento da produção de auto-anticorpos.

3.2.2.2 Óxido Nítrico - Efeitos Antimicrobianos

A produção constitutiva de NO parece ser uma importante linha de ação na imunidade inata contra patógenos. A iNOS é expressa constitutivamente em tecidos com função de barreira contra as agressões do meio externo, como o epitélio do íleo (Hoffman et al., 1997) e dos seios paranasais (Guo et al., 1995).

A expressão de iNOS é descrita em uma variedade de doenças infecciosas cutâneas. Estudos recentes demonstram, por imunoistoquímica, expressão de iNOS nos granulomas infecciosos de hanseníase tuberculóide e na reação reversa hansênica (Khanolkar-Young et al., 1998). Na hanseníase dimorfa, há expressão de iNOS pelos queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, nervos dérmicos e nos granulomas (Schon et al., 2001).

Nas lesões cutâneas da leishmaniose, na forma localizada com pequeno número de parasitas, ocorre intensa expressão de iNOS em macrófagos, fibroblastos queratinócitos e nos granulomas (Qadoumi et al., 2002). Por outro lado, na leishmaniose difusa, onde são encontrados grande número de parasitas, são observadas raras células expressando iNOS nos sítios de lesão. Estas observações sugerem um papel importante do NO em limitar o crescimento do patógeno (Diaz et al., 2006).

Expressão de iNOS também ocorre nos queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias nas lesões cutâneas de herpes-zoster (Lim et al., 2002).

A função antimicrobiana do NO ocorre por toxicidade direta no interior dos macrófagos através da reação com o ânion superóxido (O_2^-) e conseqüente produção de peroxinitrito ($HNOO^-$). Por outro lado, a função mais importante do NO na indução das imunidades inata e adaptativa contra patógenos parece residir na sua capacidade de interagir reversivelmente com grupamentos tiol e metais, promovendo a regulação de enzimas e fatores de transcrição. Essa função como molécula mediadora da transdução de sinais é responsável, por exemplo, pela inibição da infiltração linfocitária no local de deposição antigênica, contribuindo para a latência de processos infecciosos (Fang, 2004).

O NO também é capaz de inibir a cadeia respiratória bacteriana. A interação do NO com radicais tirosil, limita a síntese e o reparo do DNA bacteriano. O peroxinitrito reage com as proteínas do capsídeo viral do vírus Cocksackie inibindo a sua entrada nas células. Além disso, o NO causa a s-nitrosilação e inibição de proteinases virais e de fatores de transcrição responsáveis pela replicação viral (Padalko et al., 2004; Mannick, 2006) (Figura 4).

Mecanismos antivirais do óxido nítrico

Modificado de Mannick, 2006

Figura 4 - Mecanismos antivirais do óxido nítrico (NO). O NO reage com o superóxido para formar peroxinitrito o qual nitrata proteínas do core expressas na superfície do vírus Coxsackie levando a inibição da entrada do RNA viral na célula. O NO também faz a S-nitrosilação e inibe as proteinases virais e fatores de transcrição necessários para a replicação viral.

3.2.2.3 O Óxido Nítrico e o Sistema Imune

O NO regula a função das células imunes através de diversos mecanismos como a alteração do balanço Th1-Th2 e a regulação do recrutamento e adesão leucocitária (Mannick, 2006).

Em 1999 van der Veen et al. demonstram que baixas concentrações de NO inibem igualmente a proliferação de células Th1 e Th2, exibindo pouco ou nenhum efeito sobre a viabilidade celular e outras atividades da célula T, como a produção de citocinas (van der Veen et al., 1999).

O NO produzido no interior dos macrófagos se difunde para o exterior celular onde, na ausência de superóxido (O_2^-), passa livremente para o interior dos linfócitos T inibindo a sua proliferação. Em contrapartida, quando no ambiente extracelular ocorre reação do NO com o radical superóxido (O_2^-), há a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é incapaz de penetrar a membrana celular dos linfócitos T liberando deste modo a proliferação celular (van der Veen, 2001) (Figura 5). Estes achados demonstram que o NO desempenha efeitos antagônicos na regulação da população linfóide T, podendo funcionar tanto como um importante agente imunossupressivo no controle da resposta inflamatória (van der Veen et al., 1999; van der Veen, 2001; Mahidhara et al., 2003), quanto como mediador no desenvolvimento de processos linfoproliferativos malignos (Mannick et al., 1997; Mori et al., 1999).

Efeitos regulatórios do óxido nítrico (NO) sobre os Linfócitos T

Figura 5 - A produção do radical superóxido (O_2^-) regula a atividade do óxido nítrico (NO) sobre a proliferação dos linfócitos T. **(A)** O NO produzido no interior dos macrófagos se propaga para o interstício onde, na ausência de superóxido (O_2^-), é capaz de se difundir para o interior dos linfócitos T inibindo a sua proliferação. **(B)** Por outro lado, na presença de superóxido (O_2^-) o NO interage no meio extracelular com este radical produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$). O linfócito T é impermeável ao peroxinitrito, impedindo-o de entrar na célula, liberando assim a sua proliferação.

Em resumo, apesar da complexidade e aparente antagonismo das funções exercidas pelo NO no sistema imune, nos últimos anos os autores têm aceito que o NO é tóxico em algumas doenças infecciosas e inflamatórias e auxilia na prevenção da estimulação imune excessiva. Além disso, pode exibir algum grau de proteção contra doenças auto-imunes (Shi et al., 2001) e funcionar como uma molécula sinalizadora intra e intercelular moldando a resposta imune (Bogdan, 2001).

De acordo com os dados da literatura consultada podemos observar que existem pontos de questionamento quanto à etiopatogenia e aspectos imunopatológicos da PL. A doença é considerada como resultante de resposta tecidual a patógeno infeccioso ou de natureza desconhecida e/ou como discrasia de linfócitos T. Os trabalhos que enfocam a caracterização dos elementos celulares e de expressão molecular da resposta tecidual da doença demonstram somente subpopulações de linfócitos T (Muhlbauer et al., 1984; Shieh et al., 2001); sua natureza citotóxica (Tomasini et al., 2004; Wenzel et al., 2005); aspectos de clonalidade do receptor de células T (Dereure et al., 2000; Shieh et al., 2001; Magro et al., 2002; Weinberg et al., 2002; Tomasini et al., 2004; Magro et al., 2007) ;depleção local de células de Langerhans (Muhlbauer et al., 1984) e expressão de HLA-DR pelos queratinócitos sugerindo a presença de TNF alfa e IFN gama nos sítios de lesão (Muhlbauer et al., 1984; Smith et al., 1997).

O óxido nítrico é um mediador relacionado com os mecanismos de defesa frente a agentes infecciosos na resposta imunológica inata e adquirida. Seu envolvimento em processos infecciosos (Khanolkar-Young et

al., 1998; Schon et al., 2001; Lim et al., 2002; Qadoumi et al., 2002; Diaz et al., 2006) e inflamatórios (Kuhn et al., 1998; Ormerod et al., 1999; Lerner et al., 2000) da pele já foi comprovado. Deste modo, parece-nos interessante demonstrar e comparar a expressão de iNOS, de elementos celulares da resposta imune inata e perfil de citocinas nos sítios de lesão das formas aguda e crônica da pitíriase liquenóide.

4. Métodos

4.1 Seleção da Amostra

Foram selecionados, dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica HC-FMUSP, espécimes de biópsia de doentes com suspeita clínica e/ou diagnose histopatológica de pitiríase liquenóide, no período de 1994 a 2006. Foram consultados os respectivos prontuários médicos para se verificar a correlação clínico-patológica e características evolutivas dos doentes. Permaneceram no grupo de estudo 34 casos que preencheram todas as características (clínicas, histopatológicas e evolutivas) da doença.

4.1.1 Estratificação da Amostra

Os casos foram classificados nas formas aguda (PLA) e crônica (PLC) da doença, segundo os critérios histopatológicos definidos por Ackerman (1982) e modificados por Romani et al., (1998). Esses critérios compreendem o grau de necrose de queratinócitos, extravasamento de hemácias, densidade do infiltrado inflamatório linfóide e envolvimento do plexo vascular na derme profunda. O conjunto de características

histopatológicas que favorecem a diagnose de PLA é representado pela necrose de queratinócitos, adelgaçamento ou desaparecimento da camada granulosa da epiderme e infiltrado inflamatório em forma de cunha que envolve o plexo vascular dérmico profundo.

Para a classificação da forma de PL foi considerado o padrão morfológico histopatológico ao invés do clínico, já que a proposta era de uma avaliação “in situ” da resposta tecidual cutânea e alguns doentes apresentavam, simultaneamente, lesões das formas aguda e crônica da doença.

Da análise dos prontuários foram coletadas informações clínicas sumarizadas no Anexo C, Tabela 3. A amostra foi também estratificada segundo a idade sendo incluídos no subgrupo pediátrico pacientes com idade ao diagnóstico igual ou menor que 16 anos, o restante dos pacientes foi classificado como pertencente ao subgrupo de pacientes adultos.

4.1.2 Grupo Controle

Como controle de pele sã, para a comparação com a expressão de iNOS, foram utilizadas 10 amostras de pele normal, provenientes de cirurgias de mamoplastias e abdominoplastias. Todos os espécimes eram provenientes de indivíduos do sexo feminino, com média das idades de 38,1 anos.

4.2 Avaliação Histopatológica

Dos 34 preparados histológicos de pele embebidos em parafina, foram obtidos cortes histológicos de quatro μm e corados pela hematoxilina-eosina para a avaliação histopatológica.

A avaliação histopatológica foi feita de maneira cega, por dois patologistas de acordo com a presença/ ausência/ intensidade de: apoptose de queratinócitos (A), intensidade da espongiose (B) e da degeneração vacuolar dos queratinócitos basais (C) intensidade do extravasamento de hemácias (D), intensidade do infiltrado acometendo o plexo vascular superficial (E) e o profundo (F).

Os 6 parâmetros (A - F) foram categorizados com o valor (0) nos casos onde as alterações estavam ausentes ou eram discretas e com o valor (1) naqueles em que as alterações eram moderadas ou intensas (Anexo D, Tabela 4).

A estratificação das alterações histológicas em apenas duas categorias mostrou maior concordância entre os observadores e por isso foi a forma de avaliação utilizada para a correlação dos dados.

A quantidade de linfócitos intra-epidérmicos foi avaliada através da determinação da média aritmética de células linfóides no interior da epiderme por campo microscópico em um aumento de 400x, tendo sido avaliados 10 campos consecutivos, não coincidentes (Anexo D, Tabela 4).

4.3 Imunoistoquímica

Cortes histológicos de 4 µm foram colhidos sobre lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, código A3648) a 5%, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50°C durante 12 h para melhor aderência dos cortes.

A seguir os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol a 56°C durante 30 minutos, e à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente foram hidratados em seqüência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente.

Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas, quando necessário, a tratamento para exposição dos sítios antigênicos.

Todas as reações realizadas foram visualizadas através do cromógeno *Permanent Red* (DAKO, Carpinteria, CA, USA, código K0640) 0,13% acrescido de 40µl de levamisol (DAKO, Carpinteria, CA, USA, código X3021) para bloqueio da fosfatase alcalina endógena. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. Os cortes histológicos foram então lavados em água corrente por 30 minutos, contracorados levemente com Hematoxilina de Carazzi por 10 segundos. A seguir foram lavados em água corrente, e secos em ar ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permunt (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, código SP15-100). A presença de precipitado vermelho indicou positividade para o anticorpo primário.

Controles negativos seguiram em cada uma das reações, através da supressão do anticorpo primário durante o procedimento.

Fragments de biópsia de leishmaniose cutânea foram utilizados como controle positivo das reações para a demonstração da expressão de iNOS e células dendríticas epidérmicas CD1a⁺ (células de Langerhans). Fragmentos de biópsia de dermatofibroma foram utilizados como controle positivo da reação para a identificação dos dendrócitos dérmicos fator XIIIa⁺. Biópsias de pele de lesões de psoríase foram utilizadas como controle positivo das reações para a demonstração de IFN gama, TNF alfa e interleucina 12. Para o controle positivo de IL-10 foram utilizados fragmentos de tecido amigdalino.

4.3.1 Demonstração das Células Dendríticas CD1a⁺ (Langerhans)

Para a demonstração das células dendríticas CD1a⁺ fez-se a exposição antigênica pelo tratamento dos preparados histológicos com uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1M (MERCK, São Paulo/SP, Brasil) e 820 mL de citrato de sódio 0,1M (MERCK, São Paulo/SP, Brasil) pH 6,0. Após o preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min. Após este período, foram mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4. A seguir o material foi incubado com o anticorpo primário

monoclonal anti-CD1a (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, NE, UK, código NCL-CD1a-235), diluído a 1:200, em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos - DakoCytomation Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA, Código S0809), mantidos em câmara úmida, à temperatura de 2-8°C, por 12h. A seguir, foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 por duas vezes, por 5 min cada, à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotilado (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada. Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com o complexo Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, e novamente lavados em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada.

4.3.2 Demonstração das Células Dendríticas FXIIIa+

Para a demonstração de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ fez-se a exposição antigênica com tampão de citrato 0,1M pH 6,0 em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min da mesma forma descrita anteriormente para a detecção de células CD1a+. A seguir o material foi incubado com o anticorpo primário monoclonal anti-FXIIIa, (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, NE, UK, código NCL-FXIIIa) diluído a 1:100 em uma

solução comercial apropriada à diluição de anticorpos - DakoCytomation Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA, Código S0809), mantidos em câmara úmida, à temperatura de 2-8°C, por 12h. A seguir, foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 por duas vezes, por 5 min cada, à temperatura ambiente. Após lavagem, da mesma forma que o anticorpo anti-CD1a, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotilado (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada. Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com complexo Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, e novamente lavados em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada.

4.3.3 Demonstração da Expressão de iNOS

Para a demonstração da expressão de iNOS os preparados foram primeiramente submetidos a bloqueio das reações inespecíficas através da incubação com leite desnatado 10% (Molico, Nestlé®) em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram então incubados, sem a necessidade de recuperação antigênica prévia, com o anticorpo primário anti-iNOS, policlonal obtido em coelho (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, USA, código 482728) na diluição de 1:500

em PBS 0,01 M pH 7,4 + 1% BSA, em câmara úmida, de 2-8°C durante 12h. Após a lavagem os preparados foram incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de fosfatase alcalina (EnVision™ G|2-PA, Coelho/Camundongo, Dako Carpinteria, California, USA, código 1396).

4.3.4 Demonstração da Expressão de TNF alfa

Para a demonstração de TNF alfa fez-se a exposição antigênica com solução de tripsina 0,02% em PBS 0,05 M pH 7,4 durante 10 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio das reações inespecíficas foi feito através da incubação com leite desnatado 10% (Molico, Nestlé®) em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, foi realizada a incubação com o anticorpo primário anti-TNF alfa policlonal produzido em cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, Código N-19 sc-1350) diluído 1:50 em PBS 0,01M pH 7,4 + soroalbumina bovina (BSA) 1%, por uma noite a 4°C. Procedeu-se à lavagem em PBS três vezes, 5 min cada, seguida de bloqueio com Dual Endogenous Enzyme Block (Dako, Carpinteria, CA, USA, código S2003,) e lavagem em PBS por 5 minutos. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotinilado (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada.

Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com complexo Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, e novamente lavados em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada.

4.3.5 Demonstração da Expressão de IL-10, IL-12 e IFN gama

Para a demonstração das citocinas IL-10, IL-12 e IFN gama fez-se a exposição antigênica com tampão de citrato 0,1M pH 6,0 em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min da mesma forma descrita anteriormente para os anticorpos anti-CD1a e anti-FXIIIa . A seguir ao material foi incubado com os anticorpos primários monoclonal anti-IL-10 (R&D Systems, código MAB217) diluído a 1:25, para a detecção da IL-10; monoclonal anti - IL-12 (R&D Systems, código MAB611) diluído 1:10 para a detecção de IL-12 e monoclonal anti – INF gama (R&D Systems, código MAB 285) diluído 1:20 para a demonstração do INF gama em solução comercial apropriada à diluição de anticorpos DakoCytomation Antibody Diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA, Código S0809), os preparados foram mantidos em câmara úmida, à temperatura de 2-8°C, por 12 a 16 horas. A seguir, foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 por duas vezes, por 5 min cada, à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotilado (LSAB+, Dako

Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada. Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com complexo Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina (LSAB+, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0689) pronto para uso em câmara úmida durante 45 min à temperatura ambiente, e novamente lavados em tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada.

4.4 Análise Morfométrica

4.4.1 Análise da expressão epidérmica de iNOS e das populações de células dendríticas

A quantificação da expressão de iNOS e das células dendríticas CD1a⁺ (Langerhans) na epiderme e de dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺ na derme superficial foi realizada através da determinação da fração de área (FA) ocupada pela imunomarcação com os anticorpos específicos. Para isto, imagens digitais foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico Eclipse - 80i (Nikon, Japan), capturadas por câmera digital Nikon modelo DS-Fi1 (Nikon, Japan) através do software NSI-elements (Nikon, Japan). As imagens foram analisadas por um sistema de assistência a análise de imagens (CHPTool Cyclops, Brazil) desenvolvido em conjunto com o grupo Cyclops da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a análise da expressão de iNOS e população de células CD1a⁺, foram obtidas imagens

microscópicas consecutivas, de 640×480 pixels, com aumento de 200x representativas de toda a epiderme. Para a análise de dendrócitos dérmicos Fator XIIIa+ foram tomadas imagens em campos consecutivos da derme papilar, com aumento de 400x. Campos microscópicos com dobras ou com destruição tecidual importante foram excluídos da análise. A fração de área foi determinada a partir da contagem automática de pixels imunomarcados por cada campo de epiderme (iNOS e células CD1a+) ou de derme superficial (FXIIIa+), ambos selecionados manualmente pelo usuário do sistema. A partir dos valores de fração de área obtidos de todos os campos de epiderme para a iNOS e células de Langerhans, e de derme para as células dendríticas FXIIIa+ foi calculada a média aritmética ponderada que representou a média de fração de área de epiderme ou de derme superficial ocupada por expressão de iNOS e/ou pelas células dendríticas (Anexo E, Figura 6), (Anexo F, Tabela 6).

4.4.2 Análise da Expressão dérmica de iNOS, IL-10, IL-12 ,TNF alfa e IFN gama

A quantificação de células dérmicas que expressaram iNOS e as diferentes citocinas foi realizada através do cálculo da média aritmética de células imunomarcadas por campo microscópico de 400x. Para tanto foi utilizada uma ocular de 10x com graticulo de área conhecida (0,0625 mm²) para o aumento utilizado. Fez-se a contagem de células imunomarcadas em 12 campos randomizados de derme, para cada um dos espécimes (Anexo F, Tabela 5).

4.4.3 Análise da Expressão das Citocinas analisadas na Epiderme

A expressão das citocinas na epiderme foi feita de maneira cega, por dois patologistas, através da categorização da intensidade de positividade das reações imunoistoquímicas em dois grupos: (0) Reação ausente ou fraca e (1) Reação moderada ou intensa (Anexo G, Tabela 6). A estratificação em apenas duas categorias foi utilizada por ter mostrado maior concordância entre os observadores.

4.5 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística dos dados e construção dos respectivos gráficos, foi utilizado o software MINITAB versão 14.

A análise comparativa dos parâmetros representados por valores numéricos contínuos entre os grupos de PLA e PLC e/ou entre as categorias de expressão epidérmica das citocinas estudadas foi realizada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram comparados por este teste:

- Fração de área epidérmica ocupada por células CD1a+ dos casos de lesões de PLA e de PLC.
- Fração de área dérmica ocupada por células Fator XIIIa+ dos casos de lesões de PLA e PLC.
- Expressão de iNOS epidérmica e dérmica dos casos de PL e grupo controle de pele normal, assim como entre as formas aguda e crônica da doença.

- Expressão dérmica de cada uma das citocinas estudadas (TNF alfa, IFN gama, IL-12 e IL-10) entre o grupo de lesões de PLA e PLC.
- Expressão de iNOS na epiderme e expressão de IL-12 na epiderme.
- Fração de área epidérmica ocupada por células CD1a+ e expressão de IL-10 na epiderme.
- Fração de área epidérmica ocupada por células CD1a+ e expressão de TNF alfa na epiderme.

A presença de correlação entre dados contínuos foi estabelecida utilizando-se o coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman. Foram assim analisados:

- Correlação entre a expressão de iNOS na derme e a fração de área de derme superficial ocupada por células dendríticas FXIIIa + nas lesões de PL e nos subgrupos de lesões das formas aguda e crônica da doença.
- Correlação entre as expressões dérmicas de IFN gama e TNF alfa nas lesões de PL.
- Correlação entre as expressões dérmica de IL-12 e IL-10 nas lesões de PL.

A avaliação semi-quantitativa da expressão epidérmica das citocinas estudadas foi comparada entre as formas aguda e crônica da doença através do teste do qui-quadrado (χ^2) aplicando-se a fórmula corrigida de Yates ($\chi^2_{\text{corrigido de Yates}}$).

A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de p foi menor do que 0,05.

4.6 Ética

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CAPPesq da diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.11. 06 sob o protocolo de pesquisa nº **1055/06** (Anexo H).

5. Resultados

5.1 Caracterização da Amostra

5.1.1 Dados Clínicos

Quando analisada clinicamente a população estudada, observamos que dos 34 casos selecionados para o estudo sete (20,6%) foram classificados como a forma aguda da doença (PLA) (Figura 6) e 27 (79,4%) como a forma crônica da PL (PLC) (Figura 7) (Gráfico 1).

Figura 7 - Pitíriase liquenóide aguda (doente correspondente ao caso sete). Pápulas eritemato-purpúricas, distribuídas na face flexora do braço e antebraço.

Figura 8 - Pitíriase liquenóide crônica (doente correspondente ao caso 11). Lesões papulosas eritemato-descamativas, algumas crostosas, ao lado de máculas hipocrômicas no dorso.

Os gráficos um a oito demonstram a distribuição da amostra de pacientes segundo a faixa etária, sexo, etnia, característica das lesões dermatológicas, sintomas associados, número de crises, tratamento utilizado e duração média do tratamento em meses. O Anexo C, Tabela 3, sumariza os dados clínicos, diagnóstico histopatológico e subclassificação clínica e histopatológica das formas espectrais da doença dos casos em estudo.

Gráfico 1 – Distribuição da amostra segundo a faixa etária em anos **(A)** e segundo o subgrupo etário **(B)** crianças (idade ao diagnóstico menor ou igual a 16 anos) adultos (idade ao diagnóstico maior que 16 anos).

Gráfico 2 - Distribuição da amostra segundo o sexo. **F** - feminino, **M** - masculino.

Gráfico 3 - Pitiríase liquenóide. Distribuição dos doentes segundo a etnia.

Gráfico 4 - Pitiríase liquenóide. Distribuição dos doentes segundo o tipo de lesão dermatológica.

Gráfico 5 - Pitiríase liquenóide. Distribuição dos doentes segundo a presença de sintomas associados.

Gráfico 6 - Pitiríase liquenóide. Distribuição dos doentes segundo o número de episódios de crises da doença.

Gráfico 7 - Pitiríase liquenóide. Distribuição dos doentes segundo o tipo de tratamento a que foram submetidos.

Gráfico 8 - Pitiríase liquenóide. Distribuição dos doentes segundo o tempo de duração do tratamento em meses.

5.1.2 Dados Histopatológicos

Utilizando-se os critérios histopatológicos propostos por Ackerman (1982) e Romani et al. (1998), 15 (44,1%) dos pacientes portadores de PL foram classificados na forma aguda (PLA) e 19 (55,9%) na forma crônica da doença (PLC). O Anexo D, Tabela 4, sumariza os parâmetros obtidos na análise morfológica das 34 amostras teciduais estudadas. As Figuras 9 e 10 demonstram os aspectos histopatológicos das lesões de PLA e PLC, respectivamente.

Figura 9 - Pitiríase liquenóide aguda. **(A e B)** Epiderme exibindo extensa necrose e apoptose de queratinócitos **(A)** e adelgaçamento da camada córnea **(B)** (aumento original x100 **(A)** e x200 **(B)**). **(C e D)** Hemácias extravasadas na derme papilar com focos de ascensão em direção à epiderme. Presença de trombo hialino na luz de vaso superficial **(D)** (aumento original x200 **(C)** e x400 **(D)**). **(E e F)** Infiltrado inflamatório de mononucleares disposto ao redor do plexo vascular superficial **(E)** e profundo **(F)** (aumento original x400). Coloração pela Hematoxilina-eosina.

Figura 10 - Pitiríase liquenóide crônica. **(A - D)** Epiderme exibindo intensa exocitose de linfócitos. **(A)** Infiltrado inflamatório de mononucleares disposto ao redor de vasos do plexo superficial (aumento original x200). **(B)** Atrofia da epiderme com alterações poiquilodérmicas na derme papilar (aumento original x400). **(C)** Invasão maciça da epiderme por células linfóides, camada granulosa mantida, apoptose mínima (aumento original x400). **(D)** Espongiose e exocitose de linfócitos com células de Langerhans em íntimo contato com linfócitos intra-epidérmicos (aumento original x1000). Coloração pela Hematoxilina-eosina.

É importante ressaltar que não ocorreu correlação clinicopatológica em 35,3% dos casos, principalmente em função da classificação das lesões da forma aguda da doença. Tomando-se como referência o diagnóstico histopatológico, a concordância clinicopatológica para os casos de PLA foi de apenas 33,33%, e de 89,47% para os casos PLC (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Comparação entre a classificação dos doentes nas formas aguda e crônica da doença segundo critérios clínicos **(A)** e histopatológicos **(B)**. PLA - pitíriase liquenóide aguda; PLC - pitíriase liquenóide crônica.

O subgrupo de pacientes na faixa etária pediátrica (idade ao diagnóstico ≤ 16 anos) exibiu maior número de casos da forma aguda da doença (11/34 casos - 64,7%), já os pacientes adultos mostraram um predomínio da forma crônica da doença (13/34 casos - 76,5%) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Distribuição das lesões das formas aguda e crônica da pitíriase liquenóide nos subgrupos de pacientes adultos e pediátricos. PLA - pitíriase liquenóide aguda; PLC - pitíriase liquenóide crônica.

5.1.3 Células Dendríticas Epidérmicas (CD1a+)

As células dendríticas dérmicas CD1a+ distribuíram-se por entre os queratinócitos da camada espinhosa da epiderme. Nas biopsias de PLA estas células ocuparam uma menor fração de área de epiderme quando comparadas com as biopsias de PLC (Figura 11, Gráfico 11). A aparente rarefação epidérmica de células de Langerhans nas lesões de PLA (Figura 11A e B) foi mais proeminente na região central do segmento epidérmico das biopsias, onde se observava maior intensidade de necrose e/ou apoptose de queratinócitos (Figura 11A). Nos segmentos de epiderme adjacentes a essas áreas, o número de células CD1a+ foi maior (Figura 11B), mas não semelhante àquele observado nos casos de PLC (Figura 11C e D). Um outro aspecto interessante foi a evidente migração de células CD1a+ da epiderme em direção aos capilares da derme papilar, nos casos de PLC (Figura 11D).

Figura 11 - Células dendríticas CD1a+ epidérmicas em lesões de pitiríase liquenóide aguda e crônica. **A** e **B** - Acentuada diminuição do número de células dendríticas CD1a+ na epiderme nas lesões de PLA. **(A)** Epiderme da região central da biópsia (aumento original x400), **(B)** Epiderme da periferia da lesão (aumento original x400). **C** e **D** População de células dendríticas CD1a+ na epiderme de lesões de PLC. **(C)** Células CD1a+ distribuídas por entre os queratinócitos em toda a espessura da epiderme (aumento original x400), **(D)** Migração de células CD1a+ em direção aos capilares da derme papilar (aumento original x400). (Anticorpo monoclonal anti-CD1a com sistema de revelação Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

Quando comparamos a fração de área epidérmica ocupada pelas células dendríticas CD1a+ (células de Langerhans) entre os dois grupos de PL, verificou-se que esta era menor nos casos de PLA ($p=0,015$) (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Fração de área de epiderme ocupada por células dendríticas CD1a+. Comparação entre o grupo de lesões das formas aguda e crônica da pitíriase liquenóide. PLA - pitíriase liquenóide aguda; PLC - pitíriase liquenóide crônica. Teste estatístico de Mann-Whitney.

5.1.4 Células Dendríticas Dérmicas (FXIIIa+)

O padrão de expressão do FXIIIa nas células dendríticas dérmicas foi similar nos dois tipos de PL, não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre os mesmos. Em ambos os subgrupos foi demonstrada a presença destas células, quase que exclusivamente, na derme adjacente à junção dermo-epidérmica (Figura 12A e B) e ao redor dos capilares do plexo vascular superficial (Figura 12C). Também foi observado a presença de raros dendrócitos dérmicos FXIIIa+ distribuídos na derme profunda, junto ao plexo vascular profundo (Figura 12D).

Figura 12 - Distribuição de dendrócitos dérmicos FXIIIa+ em lesão de pitiríase liquenóide crônica. Maior concentração de células FXIIIa+ na derme superficial junto à junção dermo-epidérmica (**A e B**) (aumento original x200 (**A**) e X400 (**B**)) e ao redor do plexo vascular (**C**) (aumento original x1000). (**D**) Escassa concentração de células FXIIIa+ na derme profunda, principalmente ao redor dos vasos do plexo profundo (aumento original x1000). (Anticorpo monoclonal anti-FXIIIa com sistema de revelação Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

A fração de área de derme superficial ocupada por células dendríticas FXIIIa+ mostrou forte correlação positiva com a expressão dérmica de iNOS nas lesões de PL ($r = + 0,641$, $p < 0,001$), esta correlação se manteve quando comparados os subgrupos de lesões da forma aguda ($r = + 0,666$, $p = 0,007$) e crônica ($r = + 0,601$, $p = 0,007$) da doença (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Correlação entre a fração de área de derme superficial ocupada por células dendríticas FXIIIa+ e a expressão de iNOS na derme nos subgrupos de lesões das formas aguda e crônica da pitíriase liquenóide. PLA - pitíriase liquenóide aguda; PLC - pitíriase liquenóide crônica. (m células/cp) - média de células por campo. Coeficiente de correlação de Spearman.

5.1.5 Expressão de iNOS

A maioria das biópsias de PL estudada apresentou expressão de iNOS na epiderme. Esta expressão foi mais acentuada nos queratinócitos das camadas epidérmicas mais superficiais (Figura 13A-D). Observou-se expressão de iNOS em toda a espessura da epiderme em apenas três casos (Figura 13E-F). As células do infiltrado inflamatório, dendrócitos dérmicos e fibroblastos apresentaram forte expressão de iNOS (Figura 14A). A expressão de iNOS foi também observada nas células do endotélio vascular, assim como em outros componentes justavasculares (pericitos e dendrócitos

dérmicos) (Figura 14B-D). Em apenas uma biópsia (caso 13), houve expressão de iNOS nas células dos ductos sudoríparos écrinos.

No grupo controle de pele normal observou-se, na maioria das amostras, ausência de expressão epidérmica de iNOS (Figura 15A). Foi detectada discreta expressão da proteína nos queratinócitos das camadas superficiais da epiderme de dois espécimes controles. Na derme, houve expressão fraca no infiltrado inflamatório superficial e em células endoteliais, em apenas um caso, nas demais amostras não foi detectada expressão dérmica de iNOS (Figura 15B).

Quando as reações foram realizadas, omitindo-se o anticorpo primário anti-iNOS, não foram observadas marcações não específicas (Figura 15C e D).

Figura 13 - Expressão de iNOS na epiderme de lesões de pitíriase liquenóide crônica. (A–D) Expressão de iNOS nas camadas espinhosa e granulosa (A e D aumento x200; B e C x400). (E–F) Expressão de iNOS em toda a espessura da epiderme (aumento original x400 e x1000). (Anticorpo policlonal anti-iNOS produzido em coelho sistema de revelação EnVision fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

Figura 14 – Expressão de iNOS na derme nas lesões de pitíriase liquenóide aguda **A** e **F** e crônica **B** - **D**. (**A**) Expressão de iNOS nas células do infiltrado dérmico, dendrócitos e fibroblastos (magnificação original x400). (**B** - **D**) Expressão de iNOS no endotélio vascular e pelos elementos justavasculares) (aumento original x1000). (**E**) Expressão de iNOS nos macrófagos (aumento original x1000). (**F**) Expressão de iNOS pelas células dos ductos sudoríparos écrinos (aumento original x1000). (Anticorpo policlonal anti-iNOS produzido em coelho e sistema de revelação EnVision fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

Figure 15 - Expressão de iNOS na epiderme e derme nos controles de pele normal e na reação com omissão do anticorpo primário. **A** e **B**. Ausência de expressão na epiderme (**A**) (aumento original X200) e na derme (**B**) (aumento original x400) (Anticorpo policlonal anti-iNOS produzido em coelho e sistema de revelação EnVision fosfatase alcalina e cromógeno permanent red). **C** e **D** controles negativos (aumento original x400). (Sistema EnVision fosfatase sem o anticorpo primário e cromógeno permanent red).

A expressão de iNOS, epidérmica e dérmica, não diferiu quando comparados os grupos de PLC e PLA. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as expressões de iNOS epidérmica ($p=0,0005$) e dérmica ($p=0,0001$) entre os grupos de PL e o grupo controle de pele normal (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Expressão de iNOS na epiderme (A), e na derme (B). Comparação entre o grupo de lesões de pitíriase liquenóide e o grupo controle de pele normal. FA - fração de área. (m céls/cp) - média de células por campo. Teste estatístico de Mann - Whitney.

5.1.6 Expressão de TNF alfa

5.1.6.1 Expressão de TNF alfa na Epiderme

Os queratinócitos epidérmicos e algumas células de Langerhans apresentaram expressão citoplasmática de TNF alfa (Figura 16A e B). Este aspecto foi observado de forma semelhante nas lesões de PLA e PLC, não tendo sido detectada diferença estatisticamente significativa na expressão epidérmica desta citocina entre estes subgrupos. Em ambas as formas de PL a expressão epidérmica de TNF alfa foi mais proeminente em áreas de maior espongiose e exocitose de linfócitos com alguns linfócitos intra-epidérmicos também expressando TNF alfa (Figura 16B).

Foi detectado em nosso estudo que as lesões cutâneas de PL com expressão epidérmica de TNF alfa moderada a intensa mostraram uma menor fração de área de epiderme ocupada por células CD1a+ ($p = 0,008$) (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Fração de área de epiderme ocupada por células CD1a+ nas lesões de PL. Comparação entre o subgrupo de lesões com expressão epidérmica de TNF-alfa ausente/mínima e moderada/intensa. TNF-a - TNF-alfa, FA - fração de área. Teste estatístico de Mann-Whitney.

5.1.6.2 Expressão de TNF alfa na Derme

Quando avaliada a expressão do TNF alfa na derme, observou-se que as células mononucleares do infiltrado inflamatório, dendrócitos dérmicos, células endoteliais e fibroblastos, de ambos os grupos de PL, foram positivos para o anticorpo anti-TNF alfa (Figura 16C e D). A expressão de TNF alfa dérmica foi mais acentuada no grupo de lesões de PLA do que no de PLC ($p = 0,035$) (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Comparação da expressão dérmica de TNF alfa entre o subgrupo de lesões da forma aguda e crônica da pitíriase liquenóide. PLA - pitíriase liquenóide aguda; PLC - pitíriase liquenóide crônica; (m células/cp) - média de células por campo. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Figura 16 - Expressão de TNF alfa na pitiríase liquenóide crônica (**A e B**) e aguda (**C e D**). **A e B** - Expressão de TNF alfa nos queratinócitos, células de Langerhans e linfócitos intra-epiteliais (A - aumento original x400; B - aumento original X1000). **C e D** - Expressão de TNF alfa em macrófagos e dendrócitos dérmicos (**B**) e no endotélio vascular (**D**) (aumento original x1000). (Anticorpo monoclonal anti-TNF alfa com sistema de revelação Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

5.1.7 Expressão de IFN gama

5.1.7.1 Expressão de IFN gama na Epiderme

A expressão de IFN gama na epiderme foi observada no citoplasma dos queratinócitos, de células de Langerhans e de linfócitos intra-epidérmicos (Figura 17A e B). Esta expressão não se mostrou diferente nas formas aguda e crônica da doença.

5.1.7.2 Expressão de IFN gama na Derme

As células inflamatórias mononucleares, dendrócitos dérmicos e endotélio vascular apresentaram imunomarcação pelo anticorpo anti-IFN gama (Figura 17C e D). É interessante relatar que a mesma lesão que apresentou expressão de iNOS nos ductos sudoríparos écrinos (caso 13) mostrou, na mesma região, expressão também de IFN gama.

Figura 17 - Expressão de IFN gama na pitiríase liquenóide crônica. **A e B** - Expressão de IFN gama nos queratinócitos (**A e B**) e no infiltrado inflamatório superficial (**B**) (**A** – aumento original x400; **B** – aumento original x1000). **C e D** - Expressão de IFN gama em macrófagos, dendrócitos dérmicos (**C**) e no endotélio vascular (**D**) (aumento original x1000). (Anticorpo monoclonal anti-IFN gama com sistema de revelação Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

A expressão de IFN gama na derme foi maior no grupo de lesões da forma aguda da doença ($p = 0,005$) (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Comparação da expressão dérmica de IFN gama entre o subgrupo de lesões da forma aguda e crônica da pitíriase liquenóide. ; PLA - pitíriase liquenóide aguda; PLC - pitíriase liquenóide crônica; (m céls/cp) - média de células por campo. Teste estatístico de Mann-Whitney.

No nosso estudo, foi observada uma correlação positiva fraca entre a expressão dérmica de IFN gama e de TNF alfa nas lesões de PL ($r=0,357$, $p=0,045$) (Gráfico 17).

Gráfico 17 - Correlação entre a expressão dérmica de TNF alfa e IFN gama nas lesões de pitíriase liquenóide. (m céls/cp) - média de células por campo. Coeficiente da correlação de Spearman.

5.1.8 Expressão de IL-12

5.1.8.1 Expressão de IL-12 na Epiderme

Na avaliação da expressão da IL-12 na epiderme das lesões de PL, observou-se imunoreatividade homogênea nos queratinócitos de toda a espessura da epiderme, além de expressão nos linfócitos intra-epidérmicos (Figura 18A). Não houve diferença na expressão epidérmica de IL-12 entre as lesões da forma aguda e crônica da doença.

Quando realizada uma análise comparativa entre as expressões epidérmicas de IL-12 e iNOS, observou-se que nas lesões com maior expressão epidérmica de iNOS havia uma maior expressão epidérmica de IL-12 ($p = 0,005$) (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Expressão de iNOS na epiderme das lesões de pitíriase liquenóide. Comparação entre o subgrupo de lesões exibindo expressão epidérmica de IL-12 ausente ou mínima e moderada a intensa. FA - fração de área; EP- epiderme. Teste estatístico de Mann-Whitney.

5.1.8.2 Expressão de IL-12 na Derme

As células mononucleares e do infiltrado inflamatório dérmico, assim como as células endoteliais e elementos celulares justavasculares também apresentaram imunoreatividade para o anticorpo anti IL-12 (Figura 18B - D). Novamente a biópsia de pele com expressão de iNOS e IFN gama nas células dos ductos sudoríparos écrinos também mostrou imunomarcação para a IL-12. Não houve diferença na expressão de IL-12 na derme das lesões de PLA e PLC.

Figura 18 - Expressão de IL-12 em lesões de pitiríase liquenóide crônica. **A** - Expressão de IL-12, homogênea, pelos queratinócitos de toda a espessura epidérmica (aumento original x400). **B - D** - Expressão de IL-12 pelas células mononucleares, dendrócitos dérmicos, **(B e C)** endotélio vascular e elementos celulares justavasculares **(D)** (aumento original x1000). (Anticorpo monoclonal anti-IL-12 com sistema de revelação Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

5.1.9 Expressão de IL-10

5.1.9.1 Expressão de IL-10 na Epiderme

Observou-se imunomarcacão intensa e homogênea dos queratinócitos de toda a espessura da epiderme para IL-10 (Figura 19A - C). Esse aspecto foi observado nos dois grupos de PL. Não houve diferença na expressão epidérmica de IL-10 entre as lesões da forma aguda e crônica da doença.

Entretanto, as lesões com expressão moderada/intensa de IL-10 epidérmica apresentaram menor população de células dendríticas CD1a+ na epiderme (aferida pela fração de área epidérmica ocupada por células dendríticas CD1a+) ($p=0,023$) (Gráfico 19).

Gráfico 19 - Fração de área de epiderme ocupada por células dendríticas CD1a+ nas lesões de pitíriase liquenóide. Comparação entre o subgrupo de lesões exibindo expressão epidérmica de IL-10 ausente ou mínima e moderada a intensa. FA - fração de área. Teste estatístico de Mann-Whitney.

5.1.9.2 Expressão de IL-10 na Derme

A expressão de IL-10 na derme foi observada em células mononucleares e células endoteliais dérmicas (Figura 19C - D). Esse aspecto foi observado nos espécimes de pele dos dois grupos de PL. Também não foi observada diferença na expressão de IL-10 na derme entre o subgrupo de lesões de PLA e PLC.

Figura 19 – Expressão de IL-10 nas lesões de pitíriase liquenóide crônica. **(A – C)** Expressão de IL-10 nos queratinócitos (A - aumento original x400; B - aumento original x1000; C - aumento original x200). **(C – D)** - Expressão de IL-10 na derme em células mononucleares, dendrócitos dérmicos e endotélio vascular (C-aumento original x200; D - aumento original x1000). (Anticorpo monoclonal anti-IL-10 com sistema de revelação Streptavidina-Biotina-Fosfatase alcalina e cromógeno permanent red).

Quando comparamos as expressões dérmicas de IL-12 e IL-10 nas lesões de PL, observamos uma correlação negativa fraca entre a expressão das duas interleucinas ($r = -0,339$, $p = 0,057$) (Gráfico 20).

Gráfico 20 - Correlação entre a expressão dérmica de IL-12 e IL-10 nas lesões de pitiríase liquenóide. (m de céls/cp) - média de células que expressam a citocina por campo. Coeficiente de correlação de Spearman.

6. Discussão

A Pitiríase liquenóide (PL) é uma doença cutânea de etiologia desconhecida e pouco freqüente. Sua incidência e prevalência não são conhecidas. Alguns autores estimaram a incidência da doença em aproximadamente um caso a cada duas mil pessoas (Daoud e Pittelkow, 2003).

O presente estudo compreendeu a análise de 34 pacientes da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas FMUSP, em um período de 12 anos, que apresentavam diagnóstico clínico, histopatológico e evolutivo de pitiríase liquenóide. Esta casuística é semelhante à obtida por Magro et al. (2002), em um estudo composto por 34 pacientes portadores de PL, provenientes de dois centros médicos, em um período de 10 anos, também utilizando os critérios clínicos e histopatológicos para a seleção dos doentes. Uma revisão recente descreve, em 10 anos, uma casuística de 124 casos de pacientes pediátricos. A aparente discrepância no tamanho da casuística obtida em nosso estudo, em um período de coleta semelhante, poderia ser justificada pelo fato de que, no referido estudo, 39% dos casos foram diagnosticados exclusivamente através do aspecto clínico das lesões (Ersoy-Evans et al., 2007).

A idade ao diagnóstico dos pacientes portadores de PL inclusos neste estudo apresentou variação de dois a 73 anos, com média de 21,85 anos, sendo semelhante à casuística descrita por Magro et al. (2002).

Em nossa casuística, metade dos pacientes com diagnóstico de pitiríase liquenóide (17/34) pertencia ao subgrupo pediátrico (idade ao diagnóstico ≤ 16 anos). Neste subgrupo de pacientes, semelhante ao descrito na literatura, as lesões analisadas foram na sua maioria classificadas na forma aguda da doença (11/17) (Ersoy-Evans et al., 2007).

Encontramos uma ausência de correlação clinicopatológica em 35,3% dos casos, sendo que esta discordância ocorreu principalmente em função do diagnóstico da forma aguda da doença, onde a porcentagem de concordância clinicopatológica foi de apenas 33,3%. Esta importante discrepância foi relatada anteriormente por Tomasini et al. (2004). Os autores explicam este achado baseado na subjetividade do diagnóstico tanto clínico quanto histopatológico das formas da doença e na limitação da análise histopatológica a apenas uma amostra tecidual a qual possivelmente não representa o quadro completo e o aspecto evolutivo das lesões cutâneas. No presente estudo, foram avaliadas apenas as biopsias iniciais dos pacientes portadores de PL, o que poderia explicar a importante discordância clinicopatológica observada.

A distinção entre as formas aguda e crônica da pitiríase liquenóide é, ainda hoje, motivo de controvérsia na literatura. A maioria dos autores defende a teoria de uma doença espectral (Shieh et al., 2001; Weinberg et al., 2002; Tomasini et al., 2004; Magro et al., 2007), podendo ocorrer lesões

simultâneas de ambas as formas da doença em um mesmo paciente, assim como a ocorrência de formas intermediárias e um espectro mais grave caracterizado pela forma ulcero-necrótica febril descrita por Degos (Degos et al., 1966).

Embasados no acima exposto, optamos por classificar os casos inclusos neste estudo de acordo com suas características histopatológicas, tendo em vista que o objetivo foi a avaliação das células dendríticas, da expressão de iNOS e do padrão de expressão de citocinas nos sítios de lesão da PL.

Na análise da população de células dendríticas cutâneas observamos diminuição de células de Langerhans (CD1a+) nas lesões da forma aguda da PL quando comparadas às da forma crônica da doença, sendo esta alteração mais evidente na epiderme da porção central das lesões biopsiadas. Estes mesmos achados foram descritos anteriormente por Muhlbauer et al. (1994) os quais sugerem que a depleção local das células de Langerhans (CL) nas lesões de PLA poderia estar relacionada à morte destas células secundária ao processo de destruição da epiderme e/ou ao processo de migração das mesmas para a derme.

A PLA exhibe o processo inflamatório mais acentuado no espectro de resposta tecidual da PL. Diminuição da população de CL pode ser observada nos processos inflamatórios cutâneos de maior intensidade (Larregina e Falo, 2005). Em modelos experimentais de sensibilização por contato, a depleção CL previamente à fase de indução aumenta drasticamente a resposta inflamatória local (Grabbe et al., 1995).

Uma possível explicação para a diminuição da população epidérmica de CL observada na PLA seria a morte destas células secundária a intensa destruição da epiderme que ocorre nesta forma da doença. Entretanto, mesmo na periferia das lesões onde a necrose epidérmica não foi tão pronunciada observamos uma diminuição da população de CL em relação ao grupo de lesões de PLC.

Por outro lado, a diminuição de CL na epiderme dos casos de PLA poderia refletir a migração destas células para a derme pela ação de citocinas. No nosso estudo, tanto a expressão epidérmica de TNF alfa quanto de IL-10 se correlacionaram com uma maior depleção de CL da epiderme. Estes resultados podem ser explicados pela ação de ambas as citocinas na indução da migração das CL. A IL-10 é uma citocina imunomodulatória que atua sobre as CL estimulando a sua migração (Niizeki e Streilein, 1997), ao mesmo tempo em que inibe a sua maturação (Banchereau e Steinman, 1998). O TNF alfa, ao contrário da IL-10, induz migração e maturação dos dendrócitos a qual é imprescindível para a eficiência da apresentação antigênica e ativação de linfócitos T (Bedini et al., 2007).

Com base no exposto, poderíamos sugerir que nas lesões de PL, as células de Langerhans migram com maior intensidade do microambiente epidérmico em direção aos linfonodos regionais nas lesões da forma aguda da doença possivelmente refletindo um maior aporte antigênico e/ou uma resposta individual mais exuberante a determinados estímulos. No controle deste processo está de um lado o TNF alfa propiciando uma maior eficiência da ativação de linfócitos T específicos, secundária a qualidade da

apresentação antigênica realizada pelas CL maduras. Por outro lado, a IL-10 proporcionaria uma apresentação antigênica inadequada, decorrente da migração de CL imaturas resultando na indução de tolerância periférica a estes antígenos podendo ser responsável pela involução das lesões, observada em parte dos casos de PL.

O outro elemento dendrocítico cutâneo analisado, no presente estudo, é representado pelas células dendríticas Fator XIIIa+. Estas células mostraram-se proeminentes e abundantes nas lesões, entretanto sem diferenças entre os grupos de PLA e PL.

O papel das células dendríticas FXIIIa+, não está ainda totalmente definido. Estudos recentes apontam para um espectro de função desta população dendrocítica. Estas células parecem ter variações de sua função de acordo com o microambiente, podendo adquirir função de célula apresentadora de antígenos (APC) à semelhança das células de Langerhans, ou função fagocítica, como os macrófagos (Nestle e Nickoloff, 2007; Zaba et al., 2007).

Especulamos se na PL as células dendríticas dérmicas FXIIIa+ estariam atuando como APC à semelhança do que ocorre na psoríase. Nestle et al., (1994) demonstraram que, os dendrócitos dérmicos nas lesões cutâneas de psoríase, são mais eficientes na estimulação de linfócitos T inativos através da maior produção de IFN γ e IL-2, quando comparados às células dendríticas provenientes do sangue destes mesmos pacientes ou com dendrócitos dérmicos de indivíduos saudáveis. Embora não tenhamos realizado técnicas de dupla-marcação, observamos células dérmicas, com

morfologia dendrítica imunomarcadas com os anticorpos anti-iNOS e anti-TNF α , assim como com anticorpos anti-INF γ , IL-12 e IL-10. Estes achados, em consonância com o proposto por Nickoloff et al. (1991) em relação à patogenia da psoríase, sugerem uma possível participação desta população celular no processo inflamatório nas lesões de PL, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e de NO pela ação da iNOS.

Embora em nosso estudo, em relação aos dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺, não tenhamos comparado as lesões de PL com controles de pele normal, observamos que esta população mostrou-se expressiva na derme papilar tanto nas lesões da forma aguda, quanto da forma crônica da doença. Como o observado por nós na PL, as células dendríticas dérmicas FXIIIa⁺ apresentam-se proeminentes e participantes da resposta tecidual de outros processos cutâneos mediados por linfócitos T (Deguchi et al., 2002). Vale ressaltar que as células dendríticas dérmicas FXIIIa⁺ mostram-se aumentadas na necrólise epidérmica tóxica, onde a expressão de iNOS pelos queratinócitos é também observada (Hermanns-Le et al., 1999).

As células dendríticas funcionam como biosensores do microambiente cutâneo transmitindo informações entre o sistema imune inato e adaptativo. Devido à sua alta plasticidade desempenham ainda papel importante no remodelamento tecidual (Larregina e Falo, 2005; Nestle e Nickoloff, 2007).

Com relação à expressão de iNOS, nosso estudo não demonstrou diferenças entre os subgrupos de lesões de PLA e PLC. Entretanto, observamos maior expressão epidérmica e dérmica de iNOS nas lesões de PL quando comparadas ao grupo controle, composto por amostras de pele

normal. A expressão de iNOS epidérmica no grupo controle foi observada em apenas dois espécimes e na derme de apenas um. O grupo controle exibiu média etária pouco superior ao do grupo de PL, o que poderia sugerir que a expressão de iNOS nas amostras de pele normal foi menor em função da faixa etária dos indivíduos selecionados. Contrariando esta hipótese, Ferrini et al. demonstram que o envelhecimento é acompanhado de indução espontânea da expressão de iNOS tecidual (Ferrini et al., 2001).

A produção de óxido nítrico (NO) tem sido descrita em condições fisiológicas e patológicas na pele (Bruch Gerhaz et al., 1998; Cals-Grieson e Ormerod, 2004). Nas últimas décadas o NO foi reconhecido como uma das mais versáteis moléculas envolvidas no sistema imune. Os efeitos do NO são pleiotrópicos e muitas vezes antagônicos, sendo dependentes de variáveis distintas, como a concentração da molécula, microambiente e célula-alvo, podendo tanto estimular quanto inibir a resposta inflamatória. Efeitos protetores e tóxicos desta molécula são muitas vezes encontrados simultaneamente (Bogdan, 2001).

A etiologia da PL é ainda hoje desconhecida. Vários trabalhos sugerem a participação de agente infeccioso como provável fator etiológico do processo (English et al., 1995; Smith et al., 1997; Rongioletti et al., 1999; Tsai et al., 2001; Klein et al., 2003; Boralevi et al., 2003; Tomasini et al., 2004; Teggi et al., 2005). Nosso estudo demonstrou expressão de iNOS pelos queratinócitos das lesões de PL. A expressão desta sintase poderia ser desencadeada pela ligação de algum microorganismo aos receptores de reconhecimento do tipo Toll (TLR), com conseqüente ativação do mesmo, e

indução da expressão da iNOS e produção de NO além de citocinas (Kropf et al., 2004; Vazquez-Torres et al., 2004; Lebre et al., 2007). O NO assim produzido, poderia mediar a resposta imune inata contra um possível patógeno envolvido na etiologia da PL. A importância desta molécula na imunidade inata contra patógenos já está estabelecida na leishmaniose cutânea (Diaz et al., 2006) e em outras doenças infecciosas (Bogdan, 2001).

É importante ressaltar, que em uma das biopsias analisadas em nosso estudo foi evidenciada a expressão concomitante de iNOS, IFN gama e IL-12 nas células dos ductos sudoríparos écrinos. Baseado no acima exposto, este achado poderia, novamente, sugerir a participação destas células na imunidade inata contra patógenos. A produção de NO, por via não enzimática, por bactéria comensais residentes neste microambiente é importante no desenvolvimento deste tipo de resposta contra diversos microorganismos (Weller et al., 2001). A detecção da expressão de HLA-DR pelas células dos ductos sudoríparos écrinos nas lesões de PLA (Muhlbauer et al., 1984) está de acordo com esta possibilidade.

Favorecendo o possível efeito protetor da expressão da iNOS e sua atuação na resposta imune inata nas lesões de PL, observamos que, as lesões com maior expressão de iNOS epidérmica acompanhavam-se de maior expressão de IL-12. Este fato pode ser explicado pela atuação desta citocina na indução da NO sintase no microambiente epidérmico (Diaz et al., 2006). Apesar de não ter havido correlação entre expressão epidérmica de iNOS e as demais citocinas estudadas, observamos imunomarcagem concomitante de queratinócitos com TNF alfa, IFN gama

e IL-10, em ambos os grupos de PL. Nas lesões de leishmaniose cutânea localizada a expressão concomitante de iNOS, IL-12, e IFN gama nos queratinócitos foi associada a uma resposta imunológica de padrão Th1 e conseqüente processo de cura das lesões (Diaz et al., 2006). A expressão de IL-10 na epiderme das lesões de PL poderia fornecer um efeito contra-regulatório no controle do processo inflamatório. A IL-10 não é expressa de modo constitutivo na epiderme da pele normal, mas pode ser induzida, por exemplo, após a exposição à radiação ultravioleta B quando desempenha papel fundamental nos mecanismos de indução de imunossupressão (Shen et al., 1999).

Os queratinócitos normalmente não expressam o HLA-DR, entretanto sua expressão nestas células pode ser induzida pela ação do IFN gama (Smith et al., 1997). Os queratinócitos ao expressar HLA-DR podem atuar como células apresentadoras de antígeno e intervir no processo inflamatório produzindo citocinas, influenciando a função das células dendríticas e desempenhando papel fundamental no recrutamento e/ou retenção de células inflamatórias no microambiente epidérmico (Banerjee et al., 2004). Observamos, no nosso estudo, intensa expressão de IFN gama na epiderme. Este achado é consistente com a expressão de HLA-DR pelos queratinócitos descrita nas lesões de PLA (Muhlbauer et al., 1984). A partir destas considerações, e do exposto anteriormente podemos supor que nas lesões de PL os queratinócitos atuam como células participantes do sistema imune podendo ser os iniciadores e/ou perpetuadores do processo inflamatório.

Levando-se em conta os efeitos lesivos e citotóxicos do NO (Ormerod et al., 1999; Lerner et al., 2000; Bogdan, 2001; Lim et al., 2002) poderíamos esperar uma maior expressão de iNOS nas lesões classificadas como PLA, já que as mesmas mostram características de citotoxicidade mais expressivas como a lesão epidérmica e apoptose de queratinócitos. Os resultados obtidos sugerem que, nas lesões de PL, a presença do NO parece não estar relacionada às alterações citotóxicas epidérmicas. Diferente do que ocorre em outras dermatoses como a necrólise epidérmica tóxica, Síndrome de Stevens-Johnson e nas lesões cutâneas agudas de Herpes-zoster, nas quais a acentuada expressão epidérmica de iNOS foi relacionada a proeminente apoptose de queratinócitos característica destes processos (Lerner et al., 2000; Lim et al., 2002).

A PL é atualmente considerada uma discrasia linfóide, com potencial para aparecimento e manutenção de clones e oligoclones de linfócitos (Guitart e Magro, 2007). A expressão dérmica de iNOS, observada nas lesões de ambas as formas de PL, poderia estar relacionada tanto com o controle negativo da proliferação dos linfócitos T (Mannick, 2006), como com os mecanismos de proteção da apoptose dos linfócitos infiltrantes, presente nos processos linfoproliferativos malignos (Mannick et al., 1997; Zhao et al., 1998; Mori et al., 1999). A proteção da indução da apoptose pelo NO, localmente produzido via iNOS, seria um dos fatores envolvidos na manutenção de oligoclones e clones de linfócitos nos sítios de lesão da PL.

Expressão de iNOS foi também observada de modo intenso no endotélio vascular nas lesões de PL. O NO produzido pela iNOS, poderia

representar a substância vasoativa liberada em altas doses nas lesões de PL, proposta por Black e Marks (1972), justificando a vasodilatação e o extravasamento de eritrócitos, que são características histopatológicas frequentemente observadas nas lesões de PL. Esta possibilidade é reforçada pelo fato de que, durante o processo inflamatório, citocinas modulam a função endotelial e a indução da expressão de iNOS, contribuindo para a formação do eritema das lesões cutâneas (Suschek et al., 2004).

A expressão de iNOS por célula endoteliais é observada em outros processo inflamatórios e infecciosos da pele. A iNOS é expressa pelo endotélio vascular na dermatite atópica e de contato alérgica (Rowe et al., 1997), na hanseníase (Schon et al., 2001) nas lesões de Herpes-zoster (Lim et al., 2002) e na pele de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Belmont et al., 1997). Acredita-se que o NO produzido pela célula endotelial poderia ter um papel regulatório, no processo inflamatório cutâneo (Belmont et al., 1997; Rowe et al., 1997). Este efeito é mediado pelo controle da expressão de moléculas de adesão endotelial (VCAM), intercelular (ICAM) e E-selectina (Belmont et al., 1997). Os nossos resultados incluem a PL neste grupo de lesões.

A expressão de iNOS na derme mostrou forte correlação com a população de células dendríticas dérmicas FXIIIa+. Esta correlação se manteve em ambas as formas de PL. A capacidade de produção de iNOS por células dendríticas ainda é controversa. Existem estudos referindo a incapacidade das células dendríticas em produzir iNOS (Blank et al., 1996). Entretanto, outros autores demonstraram, através de técnicas de reação em

cadeia da polimerase, a produção desta sintase por células dendríticas isoladas da pele (Qureshi et al., 1996).

Diante da variedade de funções biológicas exercidas pelo NO o significado da associação entre a expressão de iNOS e a população de células dendríticas dérmicas FXIIIa+ nas lesões de PL é difícil de ser determinado. Uma das possibilidades está relacionada à função sentinela desempenhada pelas células dendríticas e mediada pelo NO como mensageiro molecular, na transmissão de informações ao sistema imune. A presença de correlação entre células dendríticas FXIIIa+ e expressão de iNOS na derme superficial nas lesões de PL, se mostra como um forte indicador do desempenho conjunto desta célula e desta molécula na interface de comunicação entre a pele e o sistema imune central. Os dendrócitos dérmicos pela sua localização na derme papilar e ao redor dos vasos, funcionariam como mediadores de estímulos tanto exógenos, provenientes da epiderme, quanto endógenos oriundos dos vasos sangüíneos (Nickoloff et al., 1991).

Uma outra consideração a ser feita baseia-se no papel do NO (Lee et al., 2001) e das células dendríticas dérmicas Fator XIIIa+ (Nestle e Nickoloff, 2007) no remodelamento tecidual. Entretanto, no nosso estudo, não encontramos diferenças na intensidade de expressão dérmica de iNOS, assim como na população de células dendríticas FXIIIa+, entre o grupo de lesões de PLA e PLC. A PLA caracteriza-se por acentuada destruição tecidual, seguida de maior intensidade nos processos de remodelação o que justificaria um aumento nesta população dendrocítica e na expressão

cutânea de iNOS. Entretanto, a falta de detecção de uma maior expressão de iNOS na derme das lesões de PLA poderia ser secundária ao tempo de evolução das lesões biopsiadas, já que foi demonstrado que a expressão de iNOS é observada nas fases precoces do processo de reparação, com pico de expressão 24 horas após a lesão (Lee et al., 2001).

Poucos são os trabalhos que envolvem as características da resposta imune nos sítios de lesão da PL. O consenso da literatura atual é de que se trata de processo mediado por linfócitos T, com imunofenótipo citotóxico (Tomasini et al., 2004; Wenzel et al., 2005). Encontramos somente um trabalho na literatura que enfoca a população de CL nas lesões de PLA. Não encontramos qualquer menção à população de dendrócitos dérmicos ou à participação de citocinas na resposta tecidual cutânea da PL.

A detecção, no nosso estudo, de uma maior expressão de TNF alfa na derme do grupo de lesões de PLA deve estar associada à maior magnitude da resposta inflamatória observada neste espectro da PL. O desenvolvimento da forma hiperaguda úlcero-necrótica da PLA foi relacionado ao aumento dos níveis séricos de TNF alfa, sendo proporcional ao aparecimento de sinais de citotoxicidade tecidual (Tsianakas e Hoeger, 2005).

Não houve diferença na expressão epidérmica de IFN gama entre os grupos de PL. Entretanto, a expressão dérmica de IFN gama foi também maior no grupo de PLA. Poderíamos relacionar esse resultado à maior prevalência de linfócitos T citotóxicos CD8+ nesta forma da PL (Muhlbauer et al., 1984; Tomasini et al., 2004). O recrutamento precoce de células T CD8+ seguido de apoptose dos queratinócitos, nas lesões de dermatite de contato,

foi relacionado à presença de IFN gama (Akiba et al., 2002). Esta mesma dinâmica poderia estar envolvida no desenvolvimento das lesões de PLA.

A correlação observada entre as expressões dérmicas de TNF alfa e IFN gama nas lesões de PL, reforçam a possibilidade de predomínio de resposta imune celular de padrão Th1 neste processo cutâneo, assim como a ação sinérgica destas citocinas na indução de produção local de iNOS (Liew et al., 1990).

Observamos expressão de IL-12 por queratinócitos e células dendríticas epidérmicas nas duas formas de PL. Poderíamos especular se a imunomarcagem de queratinócitos, observada no material estudado, seria artefactual. Além dos resultados de controles negativos das reações, as nossas observações na PL, são embasadas por dados da literatura que demonstram expressão e produção de IL-12 por queratinócitos em processos inflamatórios (Yawalkar et al., 2000) e infecciosos (Diaz et al., 2005) da pele. Como observado na PL, a expressão de IL-12 nos processos cutâneos caracterizados por espongiose e acentuada exocitose de linfócitos, sugere a presença de um microambiente inflamatório, composto por linfócitos T, expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias e, particularmente o IFN gama propiciando a produção de IL-12 pelos queratinócitos.

Demonstramos ainda a presença de uma correlação negativa entre a expressão dérmica de IL-12 e IL-10 nas lesões de PL. Este achado é consistente com a função antagônica, respectivamente pró e antiinflamatória desempenhada por essas interleucinas. Na psoríase, que assim como a PL é um processo cutâneo mediado por linfócitos T citotóxicos, a IL-10 participa

como modulador da resposta imune (Boniface et al., 2005). A IL-10 expressa na derme nas lesões de PL poderia funcionar como um mecanismo modulador da resposta inflamatória e/ou monitorar a proliferação de clones de células T (Magro et al., 2007).

A IL-10 atua também nos processos de reparação e remodelamento cutâneos (Ohshima e Sato, 1998; Sato et al., 1999). Poderíamos interpretar a presença de IL-10 como sendo mediadora dos processos de reparação cutânea observada nas lesões de PL, particularmente na PLA. Apesar disto, não encontramos maior expressão de IL-10 nos casos com maior destruição e posterior remodelamento tecidual, observados nesta forma da PL.

Os resultados obtidos, associados aos dados de literatura, configuram a PL como um processo cutâneo onde atuariam elementos da imunidade inata, representados pela população de células dendríticas da pele e produção de NO via expressão de iNOS, e da imunidade específica com predomínio de citocinas do padrão Th1.

As características histopatológicas de citotoxicidade, como a acentuada apoptose de queratinócitos e os sinais de agudização do processo inflamatório observados, principalmente no espectro das lesões de PLA, podem estar relacionadas à ação do TNF alfa e IFN gama nos sítios de lesão.

Um modelo plausível para explicar a patogênese da PL teria como evento primário a perturbação da homeostase imune dos queratinócitos com subsequente ativação de células T citotóxicas efetoras. A resposta anormal a partir do estímulo antigênico inicial, com liberação de citocinas pró-inflamatórias e de NO, via iNOS, não controlada adequadamente pela IL-10,

seria a responsável pela persistência temporal e/ou recrudescência das lesões de PL. O NO, produzido via iNOS, propiciaria através de mecanismos de proteção de apoptose, a manutenção de linfócitos T nos sítios de lesão favorecendo o desenvolvimento de um ambiente de discrasia linfóide.

7. Conclusão

O presente estudo nos permitiu as seguintes conclusões:

1. A população de células de Langerhans mostrou-se diminuída nas lesões com características histopatológicas de pitíriase liquenóide aguda, quando comparadas as de pitíriase liquenóide crônica. Esta depleção correlacionou-se com a maior expressão epidérmica de interleucina 10 e fator de necrose tumoral alfa.
2. Os dendrócitos dérmicos Fator XIIIa+ mostraram-se numerosos e proeminentes na resposta tecidual da pitíriase liquenóide, entretanto, sem diferenças significativas entre as lesões com características histopatológicas das forma aguda e crônica da doença.
3. Observou-se expressão de iNOS epidérmica e dérmica semelhante nas lesões com características histopatológicas da pitíriase liquenóide aguda e da pitíriase liquenóide crônica. A expressão de iNOS foi maior na pitíriase liquenóide quando comparada ao grupo de pele normal controle.
4. Detectamos correlação positiva entre a população de dendrócitos dérmicos fator XIIIa+ e a expressão de iNOS na derme.

5. Houve maior expressão de TNF alfa e IFN gama na derme das lesões com características histopatológicas de pitíriase liquenóide aguda quando comparadas às de pitíriase liquenóide crônica, as quais se correlacionaram com a maior intensidade de alterações inflamatórias observadas nesta forma da doença.
6. Obsevamos correlação positiva entre a expressão, na derme, do fator de necrose tumoral alfa e de interferon gama nas lesões de pitíriase liquenóide.
7. Houve correlação negativa entre a expressão dérmica das interleucinas 12 e 10 nas lesões de pitíriase liquenóide.

8. Anexos

Anexo A

Tabela 1 - Resumo dos estudos relatando a associação da pitíriase liquenóide com diferentes agentes infecciosos

Autor	Ano	Casos	Subtipo	Deteção	Agente
Takahashi e Atsumi	1993	1	PLC	cultura	<i>Streptococcus β-hemolítico e Staphylococcus aureus</i>
English et al.	1995	2 (casal)	PLEVA	cultura	<i>Streptococcus β-hemolítico</i>
Smith et al.	1997	5	PLEVA	Não referida	HIV
Rongioletti et al.	1999	1	PLEVA	Sorologia	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tsai et al.	2001	1	FMHD	Sorol., IHC, PCR, ISH	CMV
Boralevi et al.	2003	8/13	2-PLEVA 6-PLC	PCR	VZV
Klein et al.	2003	1	PLC	Sorologia	EBV
Tomasini et al.	2004	9/30	PLEVA	PCR	PVB19
Zechini et al.	2005	1	PLC	Sorologia, PCR	VHC

PLEVA – pitíriase liquenóide aguda, **PLC**– pitíriase liquenóide crônica, **Sorol.** – sorologia, **IHC** – imunoistoquímica, **ISH** – hibridização “in situ”, **PCR** – reação em cadeia pela polimerase, **HIV** – vírus da imunodeficiência humana, **CMV** – citomegalovírus, **VZV** – vírus da Varicela-Zoster, **EBV** – vírus Epstein-Barr, **PVB19** – parvovírus B19, **VHC** – vírus da hepatite C.

Anexo B

Tabela 2 - Resumo dos estudos relatando a detecção de clonalidade no rearranjo dos genes do TCR em lesões de pitíriase liquenóide

Autor	Ano	Casos	Subtipo	Deteção	Resultado
Dereure et al.	2000	20	PLEVA	PCR + heteroduplex Gene TCR γ	13/20 (65%)
Shieh et al.	2001	6	PLC	PCR + DGGE Gene TCR γ	3/6 (50%)
Weinberg et al.	2002	27	14 PLEVA 13 PLC	PCR + DGGE Gene TCR γ	8/14 PLEVA 1/13 PLC Clone CD8
Magro et al.	2002	35	7 PLEVA 28 PLC	PCR + SSCP Gene TCR γ	25/27 Clone CD4
Tomasini et al.	2004	40	36 PLEVA 4 PLC	PCR multi + DGGE ^{high} Gene TCR γ	3/30(10%)
Magro et al.	2007	46	PL	PCR multi+ eletroforese em gel high Gene TCR β	15/46(24 com restrição)

PLEVA – pitíriase liquenóide aguda, **PLC** – pitíriase liquenóide crônica, **PCR mult** – Reação em cadeia pela polimerase multiplex, **SSCP** – polimorfismo de conformação de fita simples, **DGGE** – eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, **DGGE high** – eletroforese em gel de alta resolução com gradiente de desnaturação, **gene TCR γ** – gene da cadeia gama do TCR, **gene TCR β** – gene da cadeia beta do TCR, **CD4** – “Cluster differentiation“ 4, **CD8** – “Cluster differentiation“ 8.

Anexo C

Tabela 3 - Subclassificação clínica e histopatológica das formas aguda e crônica da doença e avaliação de dados clínicos e das alterações histopatológicas nas biópsias de lesões de pitíriase liquenóide

CASO	Dx. clínico	Dx. Histop.	Localização das lesões	sintomas	Nº crises	Ex. dermatológico	Histopatológico (dermatite)
1	PLC	PLC	T+M	A	1	PED	E+V
2	PLC	PLEVA	T+M	A	0	PED	V
3	PLC	PLEVA	UP	A	0	PED	E+V
4	PLC	PLC	T+M	A	0	PED	E+V
5	PLC	PLC	UP	A	0	PH	V
6	PLC	PLC	UP	P	0	PED	E+V
7	PLEVA	PLC	T+M	A	0	PE+ CH	E+V
8	PLC	PLC	T+M	A	0	PED	E+V
9	PLC	PEVA	UP	P	1	PEC	V
10	PLC	PLC	T+M	P	0	PED	E+V
11	PLC	PLC	T+M	P	0	PEC	E+L
12	PLC	PLEVA	U	P	0	PED	V+L
13	PLEVA	PLEVA	T+M	P	0	PEP	E+V
14	PLC	PLC	T+M	A	0	PEP	V+L
15	PLC	PLC	T+M	A	0	PEA	L
16	PLC	PLC	U	P	1	PEP	V
17	PLC	PLEVA	T+M	P	1	PED	E+L
18	PLC	PLC	T+M	A	0	PED	V+L
19	PLEVA	PLC	T+M	A	0	PED+necrose	V
20	PLEVA	PLEVA	U	P	0	PEP	V
21	PLC	PLC	U	P	0	PEA	E+V
22	PLC	PLC	T+M	A	1	PED	V
23	PLEVA	PLEVA	U	P	0	PEC	V
24	PLC	PLC	T+M	P	0	PH	V
25	PLC	PLEVA	T+M	A	0	PE+ CH	E+V
26	PLC	PLEVA	U	P	0	PED	E+V
27	PLC	PLEVA	U	P	0	PED+necrose	E+V
28	PLC	PLC	T+M	P	0	PE + CH	V
29	PLC	PLC	T+M	A	0	PED	V
30	PLEVA	PLEVA	T+M	A	1	PEP	E+V
31	PLC	PLEVA	T+M	A	0	PED	E+V
32	PLC	PLC	U	P	0	PEA	V+L
33	PLEVA	PLEVA	T+M	P	0	PEC	E+V
34	PLC	PLEVA	T+M	A	0	PEA	E+V

Dx – diagnóstico; **Ex** – exame; **PED** - Pápulas eritemato-descamativas; **PH** - Pápulas hiperqueratóticas; **PE** - Pápulas eritematosas; **PEC** - Pápulas eritemato-crostosas; **PEP** - Papulas eritemato purpúricas; **PEA** - Papulas eritemato acastanhadas; **CH** - crosta hemática; **E** – espongíotica; **V** - vacuolar de interface; **L** – liquenóide; **P** – prurido; **A** – assintomático; T+M - tronco e MMSS; **U** – universal; **UP** - universal poupando a face; **Nº crises** – Quantidade de episódios de recrudescimento da erupção (**0**) único (**1**) mais que 1. Faixa de dados tachados em cinza - grupo de pacientes na faixa etária pediátrica (≤ 16 anos).

Anexo D

Tabela 4 - Avaliação do número de linfócitos intra-epidérmicos e análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas da epiderme e derme nas biópsias de lesões de pitiríase liquenóide

CASO	Dx Histop.	Linf. EP (m céls/cp)	Apop QT	Espong.	Deg. vacuolar	Hemácias Extravas.	Infiltr. Superf.	Infiltr. Prof.
1	PLC	7,25	1	0	0	1	1	1
2	PLEVA	28,75	1	1	1	1	1	1
3	PLEVA	17,75	1	1	1	1	1	1
4	PLC	13	1	1	1	0	1	0
5	PLC	8,25	0	0	0	1	1	0
6	PLC	4	0	0	0	0	0	0
7	PLC	3	0	1	0	1	1	0
8	PLC	4	0	1	0	0	1	0
9	PLEVA	37,5	1	1	1	1	1	0
10	PLC	33	0	0	0	0	1	0
11	PLC	3,5	0	1	0	1	1	0
12	PLEVA	33	0	1	0	0	1	0
13	PLEVA	16	0	1	1	1	1	1
14	PLC	14,75	0	1	0	1	1	0
15	PLC	1,5	1	0	1	0	1	0
16	PLC	4,5	0	0	0	0	1	0
17	PLEVA	30,5	0	1	1	1	1	0
18	PLC	64	1	1	0	0	1	0
19	PLC	8	0	0	0	0	0	0
20	PLEVA	13,75	1	1	1	1	1	0
21	PLC	11	0	0	0	0	1	0
22	PLC	14,25	0	0	0	0	0	0
23	PLEVA	65,75	1	1	1	1	1	1
24	PLC	39,5	1	1	0	1	1	1
25	PLEVA	28,5	1	1	1	1	1	1
26	PLEVA	45,5	0	1	1	0	1	0
27	PLEVA	61,25	1	0	0	0	1	0
28	PLC	11,5	0	0	0	0	0	0
29	PLC	28,25	0	1	1	0	1	1
30	PLEVA	9	1	0	1	1	1	1
31	PLEVA	39,25	1	0	1	1	1	1
32	PLC	25	1	0	1	0	1	0
33	PLEVA	27	1	0	0	1	1	1
34	PLEVA	46,25	1	1	1	1	1	1

PLEVA – pitiríase liquenóide aguda; **PLC** – pitiríase liquenóide crônica; **Dx Histop.** – Diagnóstico histopatológico; **Linf. EP** – linfócitos intra-epidérmicos; **Apop QT** – apoptose de queratinócitos; **Espong.** – espongiose; **Deg. Vacuolar** – degeneração vacuolar dos queratinócitos basais; **Hemácias Extravas.** – hemácias extravazadas na derme; **Infiltr. Superf.** – infiltrado inflamatório comprometendo o plexo vascular superficial; **Infiltr. Prof.** – infiltrado inflamatório comprometendo o plexo vascular profundo; **(0)** ausente/discreta; **(1)** moderada/intensa; **(m céls/cp)** média aritmética do número de células por campo microscópico de 400x. Faixa de dados tachados em cinza representa o grupo de pacientes na faixa etária pediátrica (≥ 16 anos).

Anexo E

Figura 6 - Metodologia computacional utilizada na determinação da fração de área (FA)

Figura 6 – Determinação da fração de área (FA). **A** – Captura da imagem a ser analisada e seleção manual de pontos representativos da positividade da reação. **B e C** – Determinação computacional do espaço elipsoidal a partir da distância de Mahalanobis dentro do cubo RGB ocupado pelos tons selecionados. **D** - Seleção manual da área de interesse (epiderme). **E** - Determinação computacional da área ocupada por pixels referentes à positividade da reação e da área total do polígono de interesse (epiderme). **F** - Cálculo da fração de área ocupada pela positividade da reação (pontos marcados) em cada caso a partir da média ponderada das análises de cada campo.

Anexo F

Tabela 5 - Diagnóstico histopatológico e avaliação quantitativa das células dendríticas cutâneas, expressão epidérmica e dérmica de iNOS e dérmica do fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e das interleucina 10 e 12 nas biopsias de lesões de pitíriase liquenóide

CASO	Dx. histopatol.	FA-CD1a EP	FA-FXIIIa EP	FA-iNOS EP	iNOS derme *	TNF-a derme *	IFN-g derme *	IL-12 derme *	IL-10 derme *
1	PLC	0,029	0,002	0,069	11,25	NA	48,25	34,88	4,75
2	PLEVA	0,002	0,004	0,177	15,75	15,13	37,00	3,75	103,75
3	PLEVA	0,015	0,010	0,157	1,25	NA	27,75	9,75	13,25
4	PLC	0,005	0,011	0,127	4,00	12,75	12,50	23,38	15,25
5	PLC	0,010	0,023	0,345	5,25	10,00	12,75	25,00	18,50
6	PLC	0,030	0,021	0,389	10,50	13,50	8,63	1,00	27,25
7	PLC	0,016	0,008	0,031	1,50	5,38	10,50	0,75	NA
8	PLC	0,034	0,004	0,151	2,25	6,50	16,63	13,75	23,25
9	PLEVA	0,016	0,002	0,359	5,25	18,25	24,00	30,25	0,75
10	PLC	0,009	0,003	0,417	2,50	4,00	15,13	13,00	8,75
11	PLC	0,073	0,027	0,053	6,75	38,50	75,38	36,63	17,00
12	PLEVA	0,016	0,008	0,149	2,75	25,38	87,00	11,38	NA
13	PLEVA	0,020	0,009	0,323	2,75	12,25	2,38	21,00	17,25
14	PLC	0,010	0,001	0,205	0,50	12,50	1,63	10,50	22,75
15	PLC	0,055	0,055	0,654	8,25	26,96	9,75	54,00	2,00
16	PLC	0,027	0,008	0,181	1,25	20,88	2,13	23,38	2,00
17	PLEVA	0,040	0,006	0,175	0,50	47,00	4,63	8,75	36,00
18	PLC	0,053	0,008	0,336	6,25	19,88	33,38	0,00	72,75
19	PLC	0,040	0,004	0,098	14,75	25,38	0,88	4,88	40,25
20	PLEVA	0,002	0,017	0,188	0,50	10,50	14,13	9,25	70,75
21	PLC	0,018	0,005	0,080	3,25	11,63	12,88	11,50	4,00
22	PLC	0,103	0,008	0,173	1,50	4,13	4,00	3,75	7,00
23	PLEVA	0,001	0,001	0,043	0,00	39,25	22,50	1,88	8,50
24	PLC	0,018	0,009	0,205	2,75	20,75	12,63	5,25	41,25
25	PLEVA	0,032	0,024	0,236	9,50	20,38	38,00	8,50	12,75
26	PLEVA	0,030	0,010	0,107	3,25	15,25	15,88	5,38	11,75
27	PLEVA	0,001	0,008	0,275	0,50	7,50	29,38	10,00	25,75
28	PLC	0,064	0,008	0,365	1,75	3,38	14,00	15,50	16,25
29	PLC	0,097	0,081	0,395	17,00	4,13	0,38	6,50	66,25
30	PLEVA	0,037	0,010	0,280	14,00	23,25	26,75	6,00	3,75
31	PLEVA	0,012	0,026	0,308	20,25	32,88	34,25	24,75	62,00
32	PLC	0,030	0,007	0,066	3,25	29,13	26,38	10,13	15,75
33	PLEVA	0,027	0,019	0,152	1,50	30,63	24,50	4,50	51,00
34	PLEVA	0,009	0,012	0,192	1,75	35,25	36,75	37,25	55,25

PLEVA – pitíriase liquenóide aguda; **PLC** – pitíriase liquenóide crônica; **Dx Histop.** – Diagnóstico histopatológico; **EP** – epiderme; **FA** – fração de área; **IFN-g** – interferon gama; **TNF- a** – fator de necrose tumoral alfa; * - média de células que expressam a citocina por campo; **NA** – não avaliado. Faixa de dados tachados em cinza - grupo de pacientes na faixa etária pediátrica (≤ 16 anos).

Anexo G

Tabela 6 - Diagnóstico histopatológico e avaliação semi-quantitativa da expressão das interleucina 10 e 12, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa na epiderme nas biopsias de lesões de pitíriase liquenóide

CASO	Diagnóstico histopatológico	IL-10 EP	IL-12 EP	TNF alfa EP	IFN gama EP
1	PLC	0	1	1	0
2	PLEVA	1	1	0	0
3	PLEVA	1	0	NA	0
4	PLC	1	1	1	0
5	PLC	1	1	0	0
6	PLC	1	0	1	0
7	PLC	NA	0	0	0
8	PLC	0	0	0	0
9	PLEVA	0	1	0	1
10	PLC	1	1	1	0
11	PLC	1	0	0	0
12	PLEVA	NA	0	0	0
13	PLEVA	1	1	0	0
14	PLC	1	1	1	1
15	PLC	0	1	0	0
16	PLC	0	1	0	0
17	PLEVA	1	1	0	0
18	PLC	1	0	0	0
19	PLC	0	0	0	0
20	PLEVA	1	0	0	0
21	PLC	0	0	0	0
22	PLC	0	0	0	0
23	PLEVA	0	0	1	0
24	PLC	1	0	0	0
25	PLEVA	0	0	0	0
26	PLEVA	0	0	1	0
27	PLEVA	1	1	1	1
28	PLC	1	1	0	1
29	PLC	0	1	0	0
30	PLEVA	0	0	0	1
31	PLEVA	1	0	1	0
32	PLC	1	0	1	1
33	PLEVA	0	0	1	0
34	PLEVA	1	1	1	1

PLEVA – pitíriase liquenóide aguda; **PLC** – pitíriase liquenóide crônica; **EP** - epiderme **IFN** – interferon; **TNF** – fator de necrose tumoral; **(0)** ausente/discreta; **(1)** moderada/intensa. Faixa de dados tachados em cinza representa o grupo de pacientes na faixa etária pediátrica (≥ 16 anos); **NA** – não avaliado.

Anexo H - Aprovação pelo comitê de Ética e Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.11.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa **nº 1055/06**, intitulado: **"Células dendríticas, expressão de iNOS e padrão de citocinas nas lesões de pitiríase liquenóide"** apresentado pelo Departamento de **Patologia**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **PROF^a. DRA. Mirian Nacagami Sotto**

Pesquisador (a) Executante: **DRA. Gabriella Di Giunta**

CAPPesq, 08 de novembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

9. Referências

Ackerman A. Differential diagnosis in dermatopathology 3a ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1982.

Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D, Kaneko F, Nicolas JF. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 2002; 168(6): 3079-87.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673): 245-52.

Banerjee G, Damodaran A, Devi N, Dharmalingam K, Raman G. Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004; 59(4): 385-94.

Bedini C, Nasorri F, Girolomoni G, Pita O, Cavani A. Antitumour necrosis factor-alpha chimeric antibody (infliximab) inhibits activation of skin-homing CD4+ and CD8+ T lymphocytes and impairs dendritic cell function. *Br J Dermatol* 2007; 157(2): 249-58.

Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, Amin A, Giorno R, Rediske J, Skovron ML, Abramson SB. Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(10): 1810-6.

Black MM, Marks R. The inflammatory reaction in pityriasis lichenoides. *Br J Dermatol* 1972; 87(6): 533-9.

Blank C, Bogdan C, Bauer C, Erb K, Moll H. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. *Eur J Immunol* 1996; 26(4): 792-6.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2(10): 907-16.

Boniface K, Lecron JC, Bernard FX, Dagregorio G, Guillet G, Nau F, Morel F. Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16(4): 309-19.

Boralevi F, Cotto E, Baysse L, Jouvencel AC, Leaute-Labreze C, Taieb A. Is varicella-zoster virus involved in the etiopathogeny of pityriasis lichenoides? *J Invest Dermatol* 2003; 121(3): 647-8.

Bowers S, Warshaw EM. Pityriasis lichenoides and its subtypes. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55(4): 557-72; quiz 573-6.

Brazzini B, Ghersetich I, Urso C, Cianferoni L, Lotti T. Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta during pregnancy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15(5): 458-60.

Brocq L. Les parapsoriasis. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)* 1902; 3(433-68.

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch Dermatol Res* 1998a; 290(12): 643-51.

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol* 1998b; 110(1): 1-7.

Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol* 2003; 162(1): 203-11.

Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide* 2004; 10(4): 179-93.

Clayton R, Haffenden G. An immunofluorescence study of pityriasis lichenoides. *Br J Dermatol* 1978; 99(5): 491-3.

Daoud M, Pittelkow M. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 6a ed. New York: *McGraw-Hill, Inc.*; 2003.

Degos R, Dupperat B, Daniel B. Le parapsoriasis ulceronecrotique hyperthermique. *Ann Dermatol Syph* 1966; 93(481).

Deguchi M, Aiba S, Ohtani H, Nagura H, Tagami H. Comparison of the distribution and numbers of antigen-presenting cells among T-lymphocyte-mediated dermatoses: CD1a+, factor XIIIa+, and CD68+ cells in eczematous dermatitis, psoriasis, lichen planus and graft-versus-host disease. *Arch Dermatol Res* 2002; 294(7): 297-302.

Dereure O, Levi E, Kadin ME. T-Cell clonality in pityriasis lichenoides et varioliformis acuta: a heteroduplex analysis of 20 cases. *Arch Dermatol* 2000; 136(12): 1483-6.

Diaz NL, Arvelaez FA, Zerpa O, Tapia FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31(1): 114-7.

Dupont C. Pityriasis lichenoides in a family. *Br J Dermatol* 1995; 133(2): 338-9.

English JC, 3rd, Collins M, Bryant-Bruce C. Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta and group-A beta hemolytic streptococcal infection. *Int J Dermatol* 1995; 34(9): 642-4.

Ersoy-Evans S, Greco MF, Mancini AJ, Subasi N, Paller AS. Pityriasis lichenoides in childhood: a retrospective review of 124 patients. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56(2): 205-10.

Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(10): 820-32.

Fortson JS, Schroeter AL, Esterly NB. Cutaneous T-cell lymphoma (parapsoriasis en plaque). An association with pityriasis lichenoides et varioliformis acuta in young children. *Arch Dermatol* 1990; 126(11): 1449-53.

Gelmetti C, Rigoni C, Alessi E, Ermacora E, Berti E, Caputo R. Pityriasis lichenoides in children: a long-term follow-up of eighty-nine cases. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23(3 Pt 1): 473-8.

Giustizieri ML, Albanesi C, Scarponi C, De Pita O, Girolomoni G. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2002; 161(4): 1409-18.

Grabbe S, Steinbrink K, Steinert M, Luger TA, Schwarz T. Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *J Immunol* 1995; 155(9): 4207-17.

Guitart J, Magro C. Cutaneous T-cell lymphoid dyscrasia: a unifying term for idiopathic chronic dermatoses with persistent T-cell clones. *Arch Dermatol* 2007; 143(7): 921-32.

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17): 7809-13.

Habermann R. Über die akut vereauende, nekrotisierende nterart der Pityriasis lichenoides (Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta). *Dermatol Z* 1925; (45) 42-8.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 2001; 7(4): 801-19.

Hermanns-Le T, Paquet P, Pierard-Franchimont C, Arrese JE, Pierard GE. Regulatory function of factor-XIIIa-positive dendrocytes in incipient toxic epidermal necrolysis and graft-versus-host reaction. *A hypothesis. Dermatology* 1999; 198(2): 184-6.

Hoffman RA, Zhang G, Nussler NC, Gleixner SL, Ford HR, Simmons RL, Watkins SC. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. *Am J Physiol* 1997; 272(2 Pt 1): G383-92.

Islam SA, Hay CM, Hartman KE, He S, Shea AK, Trocha AK, Dynan MJ, Reshamwala N, Buchbinder SP, Basgoz NO, Kalams SA. Persistence of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte clones in a subject with rapid disease progression. *J Virol* 2001; 75(10): 4907-11.

Jadassohn J. Über ein eigenartiges psoriasiformes und lichenoides Exanthem. *Verh Dtsch Dermatol Ges* 1984; (4): 524-9.

Juliusberg F. Über die Pityriasis lichenoides chronica (psoriasiform lichenoides Exanthem). *Arch Dermatol Syphiligr (Wien)* 1899; (50): 359-74.

Kadin ME. T-cell clonality in pityriasis lichenoides: evidence for a premalignant or reactive immune disorder? *Arch Dermatol* 2002; 138(8): 1089-90.

Khachemoune A, Blyumin ML. Pityriasis lichenoides: pathophysiology, classification, and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2007; 8(1): 29-36.

Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(3): 438-42.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999; 84(3): 253-6.

Klein PA, Jones EC, Nelson JL, Clark RA. Infectious causes of pityriasis lichenoides: a case of fulminant infectious mononucleosis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(2 Suppl Case Reports): S151-3.

Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(2): 147-56.

Kropf P, Freudenberg N, Kalis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M, Muller I. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCR mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leukoc Biol* 2004; 76(1): 48-57.

Kuhn A, Fehsel K, Lehmann P, Krutmann J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 1998; 111(1): 149-53.

Larregina AT, Falo LD, Jr. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2005; 124(1): 1-12.

Lebre MC, van der Aar AM, van Baarsen L, van Capel TM, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, de Jong EC. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 2007; 127(2): 331-41.

Lee RH, Efron D, Tantry U, Barbul A. Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *J Surg Res* 2001; 101(1): 104-8.

Lerner LH, Qureshi AA, Reddy BV, Lerner EA. Nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *J Invest Dermatol* 2000; 114(1): 196-9.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 1990; 145(12): 4306-10.

Lim YJ, Chang SE, Choi JH, Sung KJ, Bahk JH, Do SH, Lee DS. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of acute herpes zoster. *J Dermatol Sci* 2002; 29(3): 201-5.

Magro C, Crowson AN, Kovatich A, Burns F. Pityriasis lichenoides: a clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Hum Pathol* 2002; 33(8): 788-95.

Magro CM, Crowson AN, Morrison C, Li J. Pityriasis lichenoides chronica: stratification by molecular and phenotypic profile. *Hum Pathol* 2007; 38(3): 479-90.

Mahidhara RS, Hoffman RA, Huang S, Wolf-Johnston A, Vodovotz Y, Simmons RL, Billiar TR. Nitric oxide-mediated inhibition of caspase-dependent T lymphocyte proliferation. *J Leukoc Biol* 2003; 74(3): 403-11.

Mannick JB. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(2): 161-5.

Mannick JB, Miao XQ, Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272(39): 24125-8.

Marks R, Black MM. The epidermal component of pityriasis lichenoides. *Br J Dermatol* 1972; 87(2): 106-13.

Mori N, Nunokawa Y, Yamada Y, Ikeda S, Tomonaga M, Yamamoto N. Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type-I and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1999; 94(8): 2862-70.

Mucha V. Über einen der Parakeratosis variegata (Unna) bzw. Pityriasis lichenoides chronica (Neisser-Juliusberg) nahestehenden eigentümlichen Fall. *Arch Dermatol Syphiligr (Wien)* 1916; (123): 586-92.

Muhlbauer JE, Bhan AK, Harrist TJ, Moscicki RA, Rand R, Caughman W, Loss B, Mihm MC, Jr. Immunopathology of pityriasis lichenoides acuta. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10(5 Pt 1): 783-95.

Neisser A. Frage der lichenoiden Eruptionen. *Verh Dtsch Dermatol Ges* 1984; (4): 495-9.

Nestle FO, Nickoloff BJ. Deepening our understanding of immune sentinels in the skin. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2382-5.

Nickoloff BJ, Karabin GD, Barker JN, Griffiths CE, Sarma V, Mitra RS, Elder JT, Kunkel SL, Dixit VM. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *Am J Pathol* 1991; 138(1): 129-40.

Niizeki H, Streilein JW. Hapten-specific tolerance induced by acute, low-dose ultraviolet B radiation of skin is mediated via interleukin-10. *J Invest Dermatol* 1997; 109(1): 25-30.

Oksenberg JR, Panzara MA, Begovich AB, Mitchell D, Erlich HA, Murray RS, Shimonkevitz R, Sherritt M, Rothbard J, Bernard CC, et al. Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 1993; 362(6415): 68-70.

Ormerod AD, Copeland P, Hay I, Husain A, Ewen SW. The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin. *J Invest Dermatol* 1999; 113(3): 392-7.

Padalko E, Ohnishi T, Matsushita K, Sun H, Fox-Talbot K, Bao C, Baldwin WM, 3rd, Lowenstein CJ. Peroxynitrite inhibition of Cocksackievirus infection by prevention of viral RNA entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(32): 11731-6.

Pavlotsky F, Baum S, Barzilai A, Shpiro D, Trau H. UVB therapy of pityriasis lichenoides--our experience with 29 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20(5): 542-7.

Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4638-42.

Romani J, Puig L, Fernandez-Figueras MT, de Moragas JM. Pityriasis lichenoides in children: clinicopathologic review of 22 patients. *Pediatr Dermatol* 1998; 15(1): 1-6.

Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Ballotti R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99(4): 635-42.

Rongioletti F, Delmonte S, Rebora A. Pityriasis lichenoides and acquired toxoplasmosis. *Int J Dermatol* 1999; 38(5): 372-4.

Rowe A, Farrell AM, Bunker CB. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 1997; 136(1): 18-23.

Schon T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br J Dermatol* 2001; 145(5): 809-15.

Schwab R, Szabo P, Manavalan JS, Weksler ME, Posnett DN, Pannetier C, Kourilsky P, Even J. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol* 1997; 158(9): 4493-9.

Shen J, Bao S, Reeve VE. Modulation of IL-10, IL-12, and IFN-gamma in the epidermis of hairless mice by UVA (320-400 nm) and UVB (280-320 nm) radiation. *J Invest Dermatol* 1999; 113(6): 1059-64.

Shi FD, Flodstrom M, Kim SH, Pakala S, Cleary M, Ljunggren HG, Sarvetnick N. Control of the autoimmune response by type 2 nitric oxide synthase. *J Immunol* 2001; 167(5): 3000-6.

Shieh S, Mikkola DL, Wood GS. Differentiation and clonality of lesional lymphocytes in pityriasis lichenoides chronica. *Arch Dermatol* 2001; 137(3): 305-8.

Smith KJ, Nelson A, Skelton H, Yeager J, Wagner KF. Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta in HIV-1+ patients: a marker of early stage disease. The Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research (MMCARR). *Int J Dermatol* 1997; 36(2): 104-9.

Suschek CV, Mahotka C, Schnorr O, Kolb-Bachofen V. UVB radiation-mediated expression of inducible nitric oxide synthase activity and the augmenting role of co-induced TNF-alpha in human skin endothelial cells. *J Invest Dermatol* 2004; 123(5): 950-7.

Szymanski FJ. Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta: histopathological evidence that it is an entity distinct from parapsoriasis. *AMA Arch Derm* 1959; 79(1): 7-15; discussion 15-6.

Takahashi K, Atsumi M. Pityriasis lichenoides chronica resolving after tonsillectomy. *Br J Dermatol* 1993; 129(3): 353-4.

Thomson KF, Whittaker SJ, Russell-Jones R, Charles-Holmes R. Childhood cutaneous T-cell lymphoma in association with pityriasis lichenoides chronica. *Br J Dermatol* 1999; 141(6): 1146-8.

Tomasini D, Tomasini CF, Cerri A, Sangalli G, Palmedo G, Hantschke M, Kutzner H. Pityriasis lichenoides: a cytotoxic T-cell-mediated skin disorder. Evidence of human parvovirus B19 DNA in nine cases. *J Cutan Pathol* 2004; 31(8): 531-8.

Tsai KS, Hsieh HJ, Chow KC, Lin TY, Chiang SF, Huang HH. Detection of cytomegalovirus infection in a patient with febrile ulceronecrotic Mucha-Habermann's disease. *Int J Dermatol* 2001; 40(11): 694-8.

Tsianakas A, Hoeger PH. Transition of pityriasis lichenoides et varioliformis acuta to febrile ulceronecrotic Mucha-Habermann disease is associated with elevated serum tumour necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol* 2005; 152(4):794-9.

Tsukazaki N, Watanabe M, Shimizu K, Hamasaki Y, Katayama I. Photoprovocation test and immunohistochemical analysis of inducible nitric oxide synthase expression in patients with Sjogren's syndrome associated with photosensitivity. *Br J Dermatol* 2002; 147(6): 1102-8.

van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(8): 1491-500.

van der Veen RC, Dietlin TA, Pen L, Gray JD. Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. *Cell Immunol* 1999; 193(2): 194-201.

Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J, Fang FC. Toll-like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to Salmonella: importance of the Kupffer cell network. *J Immunol* 2004; 172(10): 6202-8.

Wahie S, Hiscutt E, Natarajan S, Taylor A. Pityriasis lichenoides: the differences between children and adults. *Br J Dermatol* 2007; 157(5): 941-5.

Weinberg JM, Kristal L, Chooback L, Honig PJ, Kramer EM, Lessin SR. The clonal nature of pityriasis lichenoides. *Arch Dermatol* 2002; 138(8): 1063-7.

Weller R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28(5): 511-4.

Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; 107(3): 327-31.

Weller R, Price RJ, Ormerod AD, Benjamin N, Leifert C. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens. *J Appl Microbiol* 2001; 90(4): 648-52.

Wenzel J, Gutgemann I, Distelmaier M, Uerlich M, Mikus S, Bieber T, Tuting T. The role of cytotoxic skin-homing CD8+ lymphocytes in cutaneous cytotoxic T-cell lymphoma and pityriasis lichenoides. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53(3): 422-7.

Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIA+ macrophages. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2517-25.

Zechini B, Teggi A, Antonelli M, Persechino S, Pranteda G, Versace I, Pasquazzi C, Aceti A. A case report of pityriasis lichenoides in a patient with chronic hepatitis C. *J Infect* 2005; 51(2): E23-5.

Zhao H, Dugas N, Mathiot C, Delmer A, Dugas B, Sigaux F, Kolb JP. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood* 1998; 92(3): 1031-43.