

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

ALESSANDRA ANZAI

**Análise da expressão de HLA-G, TLR 2, 3, 4 e Cav-1 no folículo piloso do
couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar**

São Paulo

2023

ALESSANDRA ANZAI

Análise da expressão de HLA-G, TLR 2, 3, 4 e 5 e Cav-1 no folículo piloso do couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar

Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11

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

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Aoki

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Anzai, Alessandra
Análise da expressão de HLA-G, TLR 2, 3, 4 e 5 e
Cav-1 no folículo piloso do couro cabeludo de
pacientes com líquen plano pilar / Alessandra Anzai.
-- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Valeria Aoki.

Descritores: 1.Alopecia 2.Líquen plano
3.Receptores toll-like 4. Antígenos HLA-G
5.Caveolina-1

USP/FM/DBD-438/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: ANZAI, Alessandra

Título: Análise da expressão de HLA-G, TLR 2, 3, 4 e 5 e Cav-1 no folículo piloso do couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Ao meu pai, meu maior incentivador.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado durante a vida através de pessoas generosas e inspiradoras.

À minha orientadora, Dra. Valéria, que esteve presente em toda minha formação profissional, minha referência de caráter, humildade, competência e serenidade.

À minha mentora Dra. Neusa, que é inspiração constante de grandeza e altruísmo.

Aos meus mestres Dr. Ricardo e Dra. Mirian aos quais tenho profunda admiração, cujos ensinamentos extrapolam a dermatologia.

Ao meu orientador no exterior Dr. Ivan e à amiga Beatriz por terem me acolhido e me guiado durante meses de fragilidade e intenso crescimento.

Às amigas da tricologia Aline, Andreia, Carol, Camila, Karina, Priscila; aos amigos da dermato e da vida; por serem apoio, ânimo e abrigo, por trazerem alegria e leveza à minha jornada.

Ao Dr. Burns e ao Dr. Paiva pela generosidade e gentileza quando precisei ser guiada além da dermatologia.

À Dra. Naiura, Antônio, Marcelo, Ruth, Reginaldo e Luciana pela importantíssima contribuição, pelo trabalho competente.

Às Professoras Dra. Carla Pagliari, Dra. Darlene Silva Polito e Dra Mirian Sotto que estiveram na banca de qualificação e sugeriram significativas contribuições ao projeto de tese de doutorado.

Aos pacientes, residentes e complementandos que são o propósito de todo o processo, meu incentivo de saber.

Ao médico Wilson e minha terapeuta Giovana pelo cuidado e suporte imprescindível.

Ao meu pai, mãe e irmã por serem meus primeiros professores, por serem meu colo e minha coragem.

Ao meu marido que me ensina diariamente o significado de amor.

À FUNADERSP pelo auxílio financeiro concedido (Projeto 71-2018).

À CAPES/PRINT pela concessão da bolsa de estudos no exterior (Processo: 88887.694579/2022-00).

“É junto dos bão que a gente fica mió”

Guimarães Rosa

RESUMO

Anzai A. Análise da expressão de HLA-G, TLR 2, 3, 4 e 5 e Cav-1 no folículo piloso do couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

Introdução: O líquen plano pilar (LPP) é uma alopecia cicatricial primária que causa grande impacto na qualidade de vida pela perda irreversível de cabelos e presença de prurido, ardor e dor. A histopatologia é caracterizada por inflamação liquenoide que agride o folículo piloso (FP), especificamente no istmo, onde residem as células-tronco foliculares. A etiopatogenia é desconhecida e conseqüentemente os tratamentos são pouco eficazes. **Objetivos:** Avaliar a expressão de toll-like receptors 2, 3, 4 e 5 (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5), do Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) e de Caveolina-1 (Cav-1), em espécimes de couro cabeludo de pacientes com LPP forma clássica, tanto nas áreas clinicamente afetadas (LPP-A) quanto nas áreas clinicamente não afetadas (LPP-NA), em comparação com controles saudáveis (CS) e correlacionar a expressão dos marcadores com o índice de atividade de LPP (LPPAI) e com a intensidade do infiltrado inflamatório. **Métodos:** As 31 amostras LPP-A (n=10), LPP-NA (n=10) e CS (n=11) foram submetidas a estudo anatomopatológico, imuno-histoquímico e/ou imunofluorescência. Os testes estatísticos de correlação de Spearman, análise de variância (ANOVA) de duas vias e teste de Tukey foram analisados pelo software GraphPadPrism 10.0. **Resultados:** O TLR2 e o TLR3 expressam padrão citoplasmático em todo o FP, exceto na bainha radicular interna (BRI). O TLR3 no istmo tem expressão mais intensa nos CS, intermediária em LPP-NA e menos intensa em LPP-A. A expressão de TLR3 em LPP-A tem correlação forte negativa com LPPAI. A expressão de TLR4 e TLR5 tem padrão citoplasmático, presente na camada basal no infundíbulo, em todas as camadas da bainha radicular externa (BRE) na região de istmo e suprabulbar, presente discretamente na BRI e ausente no bulbo. O HLA-G expressa padrão citoplasmático na camada granulosa no infundíbulo, padrão perinuclear na BRE no istmo, suprabulbar e bulbo, e é ausente na BRI. A Cav-1 expressa padrão membranoso na camada basal no infundíbulo, camada basal da BRE

na região do istmo, é ausente na BRI e discretamente positiva na BRE na região suprabulbar e bulbo. Na avaliação anatomopatológica, amostras de LPP-NA apresentam infiltrado inflamatório ao redor do istmo de intensidade equivalente ou menor que LPP-A. Infiltrado inflamatório ao redor do istmo, degeneração vacuolar do epitélio folicular, hiperqueratose periosteal, infiltrado perifolicular rechaçado por fibrose e fibrose eosinofílica estão presentes em amostras de CS. **Conclusão:** A expressão de HLA-G, TLR 2, 3, 4 e 5 e Cav-1 varia em intensidade e padrão de acordo com a região do FP. Dentre eles destaca-se o TLR3 que é expresso no istmo dos controles saudáveis, está diminuído na área não afetada e tem ainda menor expressão na área afetada. Pesquisas futuras poderão confirmar seu papel na fisiopatologia do LPP e sua relevância como marcador diagnóstico e prognóstico desta enfermidade.

Palavras-chave: Alopecia. Líquen plano. Receptores toll-like. Antígenos HLA-G. Caveolina-1.

ABSTRACT

Anzai A. Analysis of the expression of HLA-G, TLR 2, 3, 4 and 5 and Cav-1 within the scalp hair follicle of patients with lichen planopilaris [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

Introduction: Lichen planopilaris (LPP) is a primary cicatricial alopecia that causes a major impact on quality of life due to irreversible hair loss and symptoms as itching, burning and pain. Histopathology findings show a lichenoid infiltration to the hair follicle (HF), specifically around the isthmus, where the follicular stem cells reside. The etiopathogenesis is unknown and consequently the treatments are poorly effective.

Objectives: To evaluate the expression of toll-like receptors 2, 3, 4 and 5 (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5), Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) and Caveolin-1 (Cav-1) in scalp biopsies of patients with classic form of LPP, both in clinically affected areas (LPP-A) and in clinically nonaffected areas (LPP-NA) in comparison with healthy controls (HC) and correlate the expression of these markers with the LPP activity index (LPPAI) and the intensity of the inflammatory infiltrate. **Methods:** The analysis of the 31 samples of LPP-A (n=10), LPP-NA (n=10) and HC (n=11) included histopathology, immunohistochemistry and/or immunofluorescence study. Spearman's statistical correlation test, two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test were analyzed using GraphPadPrism 10.0 software. **Results:** TLR2 and TLR3 express a cytoplasmic pattern throughout the HF, except in the inner root sheath (IRS). TLR3 in the isthmus is more intensely expressed in HC, moderately expressed in LPP-NA and less intensely expressed in LPP-A. TLR3 expression in LPP-A has a strong negative correlation with LPPAI. The expression of TLR4 and TLR5 has a cytoplasmic pattern, present in the basal layer in the infundibulum, in all layers of the outer root sheath (ORS) in the isthmus and suprabulbar region, weakly present in the IRS and absent in the bulb. HLA-G expresses a cytoplasmic pattern in the granular layer in the infundibulum, a perinuclear pattern in the ORS in the isthmus, suprabulbar and bulb, and is absent in the IRS. Cav-1 expresses a membranous pattern in the basal layer in the infundibulum, basal layer of the ORS in the isthmus region, is absent in the IRS

and weakly positive in the ORS in the suprabulbar region and bulb. In histopathology evaluation, LPP-NA samples present an inflammatory infiltrate around the isthmus of equivalent or lower intensity than LPP-A. Perifollicular lymphocytic infiltrate around the isthmus, vacuolar degeneration of the follicular epithelium, periosteal hyperkeratosis and eosinophilic fibrosis are present in HC samples. **Conclusion:** The expression of HLA-G, TLR 2, 3, 4 and 5 and Cav-1 varies in intensity and pattern according to the HF region. Among them, TLR3 stands out for being expressed in the isthmus of HC, and whose intensity is reduced in LPP-NA and is even less expressed in LPP-A. Future research may confirm its role in the pathophysiology of LPP and its relevance as a diagnostic and prognostic marker for this disease.

Keywords: Alopecia. Lichen planopilaris. Toll-like receptor. HLA-G antigens. Caveolin-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da anatomia da unidade pilossebácea	28
Figura 2 - Anatomia do folículo piloso em exame histológico	31
Figura 3 - Quadro clínico do líquen plano pilar – forma clássica	38
Figura 4 - Tricoscopia do líquen plano pilar: ausência de óstios foliculares, descamação peripilar, pontos castanhos dispersos, haste distrófica e vasos sanguíneos irregulares	40
Figura 5 - Tricoscopia do líquen plano pilar: eritema difuso, descamação peripilar, pequenos tufos e pústulas	41
Figura 6 - Exame anatomopatológico do líquen plano pilar	48
Figura 7 - Hipótese proposta para o papel de Caveolina-1 no desenvolvimento da alopecia frontal fibrosante	63
Figura 8 - Lichen planopilaris activity index (LPPAI)	66
Figura 9 - Quadro clínico e tricoscopia dos locais de biópsia dos pacientes com líquen plano pilar	77
Figura 10 - Imuno-histoquímica com anti-TLR3 no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, área do infundíbulo e istmo	83
Figura 11 - Imuno-histoquímica com anti-TLR3 no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, regiões suprabulbar e bulbo	84
Figura 12 - Características da marcação com anti-TLR3 no folículo piloso por imuno-histoquímica em grande aumento	85

Figura 13 - Imuno-histoquímica com anti-HLA-G no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, área do infundíbulo e istmo	87
Figura 14 - Imuno-histoquímica com anti-HLA-G no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, regiões suprabulbar e bulbo	88
Figura 15 - Características da marcação com anti-HLA-G no folículo piloso por imuno-histoquímica em grande aumento	89
Figura 16 - Imunofluorescência direta com anti-TLR2 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar	91
Figura 17 - Imunofluorescência direta com anti-TLR3 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar	94
Figura 18 - Imunofluorescência direta com anti-TLR4 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar	97
Figura 19 - Imunofluorescência direta com anti-TLR5 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar	100
Figura 20 - Imunofluorescência direta com anti-Cav-1 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar	103
Figura 21 - Imunofluorescência direta com dupla marcação de anti-Cav-1 e anti TLR2, 3, 4 e 5 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada por líquen plano pilar	105
Figura 22 - Diferentes padrões de expressão dos TLR 2, 3, 4 e 5 no folículo piloso por imunofluorescência direta	113

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Comparação da expressão de TLR3 por imuno-histoquímica entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 85
- Gráfico 2 - Comparação da expressão de HLA-G por imuno-histoquímica entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 89
- Gráfico 3 - Comparação da expressão de TLR2 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 92
- Gráfico 5 - Comparação da expressão de TLR3 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 95
- Gráfico 6 - Análises de correlação entre as expressões de TLR3 no istmo e o índice de atividade de líquen plano pilar e intensidade do infiltrado inflamatório 95
- Gráfico 7 - Comparação da expressão de TLR4 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 98
- Gráfico 8 - Comparação da expressão de TLR5 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 101
- Gráfico 9 - Comparação da expressão de Cav-1 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso 104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das alopecias cicatriciais primárias segundo a NAHRS (North American Hair Research Society).....	34
Quadro 2 - TLRs expressos em células da pele humana, sua localização, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) e DAMPs (damage-associated molecular patterns)	53
Quadro 3 - Artigos de investigação de TLRs em líquen plano cutâneo e líquen plano oral.....	56
Quadro 4 - Artigos em diversas dermatoses com expressão negativa de HLA-G na pele humana normal	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comorbidades associadas a líquen plano pilar	43
Tabela 2 - Relação e especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica cutânea	69
Tabela 3 - Relação e especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunofluorescência direta cutânea	72
Tabela 4 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes com líquen plano pilar	76
Tabela 5 - Achados histopatológicos dos pacientes com líquen plano pilar e controles	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Alopecias cicatriciais primárias
AFF	Alopecia frontal fibrosante
AP	Área positiva
APO-1	<i>Apoptosis antigen 1</i>
AT	Área total
BRE	Bainha radicular externa
BRI	Bainha radicular interna
C3	Componente 3 do complemento
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Cav-1	Caveolina-1
CD	Cluster de diferenciação
Cód.	Código
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
EColor	Expressão da coloração
et al.	E outros
ex.	Exemplo
FP	Folículo piloso
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina

HLA-G	<i>Human leukocyte antigen G</i>
HMG-B1	<i>High-mobility group box1</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IFN- γ	<i>Interferon-gama</i>
IGF -1	Insulin-like growth fator-1
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IOD	<i>Integrated Optic Density</i>
IOD	<i>Integrated Optic Density</i>
IP	Imunoprivilégio
IRFs	<i>Interferon regulatory factors</i>
JAK	<i>Janus Associated Kinases</i>
LPC	Líquen plano cutâneo
LPO	Líquen plano oral
LPP	Líquen plano pilar
LPPAI	<i>Lichen planopilaris activity index</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
Ltd.	<i>Limited liability</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I chain-related gene A</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NAHRS	<i>North American Hair Research Society</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural killer</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPB	Pseudopelada de Brocq
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
Ref.	Referência
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Smad2	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEM	Transição epitelial para mesenquimal
TGF β 1/2	<i>Transforming growth factor β1/2</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
α MSH	<i>α-melanocyte stimulating hormone</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Por cento
>	Maior que
®	Marca registrada
/	Divisão
:	Razão
+	Positivo
=	Igual a
≠	Diferença
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
↑	Aumento
↓	Diminuição
°C	Graus Celsius
mm	Milímetro
x	Vezes
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	26
2.1	GERAIS	26
2.2	ESPECÍFICOS	26
3	REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1	FOLÍCULO PILOSO	27
3.1.1	Anatomia do folículo piloso e o ciclo capilar	27
3.1.2	Privilégio imune	32
3.2	ALOPECIAS CICATRICIAIS PRIMÁRIAS	33
3.3	LÍQUEN PLANO PILAR	35
3.3.1	Histórico e classificação	35
3.3.2	Epidemiologia	36
3.3.3	Aspectos clínicos e história natural da doença	37
3.3.4	Tricoscopia	39
3.3.5	Comorbidades	41
3.3.6	Etiopatogenia	45
3.3.7	Histopatologia	47
3.3.8	Tratamento	49
3.4	TOLL- LIKE RECEPTORS	51
3.4.1	Introdução	51
3.4.2	Os TLRs e as doenças liquenoides	54
3.4.3	TLRs nos folículos pilosos	57
3.5	HLA-G	57

3.5.1	Introdução	57
3.5.2	HLA-G e a pele	58
3.6	CAVÉOLAS E CAVEOLINAS	61
3.6.1	Introdução	61
3.6.2	Cavéolas e caveolina-1 nos folículos pilosos	62
4	MÉTODOS	64
4.1	CASUÍSTICA.....	64
4.1.1	Critérios de inclusão e exclusão	64
4.2	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	65
4.2.1	Lichen planopilaris activity index (LPPAI)	65
4.3	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	66
4.4	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	67
4.5	ANÁLISE DE IMAGEM E QUANTIFICAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS.....	70
4.6	ESTUDO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	71
4.7	ANÁLISE DE IMAGEM E QUANTIFICAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	73
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5	RESULTADOS	75
5.1	DADOS DEMOGRAFICOS E CLINICOS DOS PACIENTES COM LPP	75
5.2	DADOS DEMOGRÁFICOS DOS CONTROLES	78
5.3	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	78
5.4	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	82
5.4.1	Análise da expressão de TLR2, TLR4 e TLR5	82
5.4.2	Análise da expressão de TLR3	82
5.4.3	Análise da expressão de HLA-G	86
5.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	90

5.5.1	Análise da expressão de TLR2	90
5.5.2	Análise da expressão de TLR3	92
5.5.3	Análise da expressão de TLR4	96
5.5.4	Análise da expressão de TLR5	98
5.5.5	Análise da expressão de Cav-1.....	101
5.5.6	Análise da dupla marcação de anti-Cav-1 e anti-TLR 2, 3, 4 e 5.....	104
6	DISCUSSÃO	106
7	CONCLUSÕES	114
8	REFERÊNCIAS.....	116
	ANEXOS.....	129

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano pilar (LPP) é uma doença inflamatória crônica que agride os folículos pilosos (FP) levando à destruição folicular. Faz parte do grupo das alopecias cicatriciais primárias (ACP), doenças ainda pouco compreendidas, caracterizadas por uma via final comum de substituição da estrutura folicular por tecido fibroso. O LPP é classificado como uma ACP linfocítica¹ e acomete principalmente o couro cabeludo. Clinicamente se caracteriza por hiperqueratose folicular, eritema perifolicular e perda de orifícios foliculares. Na forma clássica, as lesões no couro cabeludo podem ser únicas ou múltiplas e geralmente envolvem o vértice e a área parietal². O LPP afeta intensamente a qualidade de vida do paciente, tanto pelo dano inestético irreversível como também pela presença frequente de sintomas como prurido, ardor e dor³.

A etiopatogenia do LPP não é conhecida e há poucos trabalhos sobre o assunto. A histopatologia é caracterizada por agressão liquenoide aos FP, especificamente à região do istmo, onde está localizado o *bulge*, local de reservatório de células-tronco foliculares, além de fibrose perifolicular concêntrica e perda das glândulas sebáceas. Nas fases tardias, há substituição dos FP por tratos fibrosos cicatriciais, que caracteriza a perda irreversível das alopecias cicatriciais^{4,5}.

Vários esquemas de tratamento foram propostos no LPP, mas até o momento nenhum foi reconhecido como padrão ouro. Os esquemas terapêuticos atuais frequentemente não alcançam o objetivo do tratamento, que visa estagnar ou reduzir a progressão da enfermidade, controlar sintomas e sinais de inflamação⁶.

Os resultados insatisfatórios dos tratamentos são consequência do conhecimento escasso dos mecanismos imunes específicos que culminam com a expressão clínica de LPP. Deste modo, torna-se relevante identificar os mecanismos patológicos envolvidos na doença para que possam futuramente servir como alvos específicos para o diagnóstico e tratamento de LPP.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar a expressão tecidual de *toll-like receptors* 2, 3, 4 e 5 (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5), do *Human leukocyte antigen G* (HLA-G) e de Caveolina-1 (Cav-1), em áreas clinicamente afetadas e não afetadas de pacientes com LPP forma clássica.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Correlacionar a expressão de TLRs, HLA-G e Cav-1 no FP dos pacientes com LPP forma clássica com o índice de atividade de LPP e com a intensidade do infiltrado inflamatório observado nos espécimes analisados por exame histopatológico;
- b) Descrever e comparar a expressão tecidual de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, HLA-G nas diferentes partes do FP (infundíbulo, istmo, suprabulbar e bulbo) em biópsias de áreas clinicamente afetadas e não afetadas de pacientes com LPP forma clássica e de controles saudáveis através de imuno-histoquímica (IHQ);
- c) Descrever e comparar a expressão tecidual de receptores TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 e comparar com a expressão de Cav-1 nas diferentes partes do FP (infundíbulo, istmo, suprabulbar e bulbo) em biópsias de áreas clinicamente afetadas e não afetadas de pacientes com LPP forma clássica e de controles saudáveis através de imunofluorescência direta (IFD).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FOLÍCULO PILOSO

3.1.1 Anatomia do folículo piloso e o ciclo capilar

O FP é um miniórgão formado pela interação do neuroectoderma e mesoderma⁷. Possui características únicas porque se modifica ao passar por ciclos de crescimento (anágeno), regressão mediada por apoptose (catágeno) e quiescência relativa (telógeno). Em cada ciclo, uma nova haste é formada, e a haste antiga é liberada em um processo regulado ativamente denominado exógeno⁸.

O FP é a estrutura essencial do cabelo porque produz a haste capilar, parte visível a partir da superfície da pele. O FP tem íntima relação com a glândula sebácea e o músculo piloerector, que em conjunto, formam a unidade pilossebácea. Além disso, o FP também interage com a complexa rede vascular e neural da pele⁷.

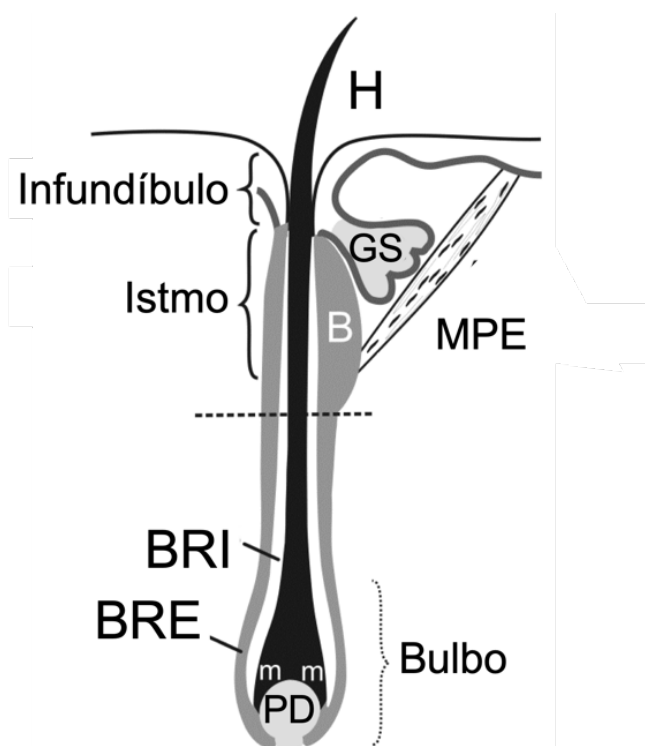
O epitélio do FP é formado por camadas de células organizadas concentricamente. A camada mais externa do FP, que faz contato com a derme, é a bainha radicular externa (BRE). Ao lado da BRE no lado dérmico, há duas camadas de fibras colágenas dispostas ortogonalmente que formam a camada vítrea conhecida como lâmina dérmica. A BRE contém um reservatório de células-tronco de queratinócitos e melanócitos denominada *bulge* (protuberância). Esta região foi primeiramente identificada nos FP de roedores como área protuberante entre a inserção do músculo piloerector e o ducto da glândula sebácea. Em humanos, as células-tronco localizam-se na mesma região, mas sem a formação de uma protuberância anatômica e o nome *bulge* tem sentido figurado⁹.

Internamente à BRE está a bainha radicular interna (BRI) que consiste em três porções: camada de Henle, camada de Huxley e a cutícula da BRI. A cutícula da BRI

se junta à cutícula da haste do cabelo, ancorando a haste capilar ao folículo. As células da BRI produzem queratinas e trico-hialina, que funcionam como um cimento intercelular. A função da BRI é servir de apoio e de molde para a haste do cabelo em crescimento, bem como para orientar seu movimento ascendente⁹.

Didaticamente, o FP é dividido em uma porção superior permanente, que não se modifica durante o ciclo capilar (até a altura da inserção do músculo piloerector), e uma porção inferior cíclica, ou transitória (figura 1).

Figura 1 - Esquema da anatomia da unidade pilosebácea



Fonte: Adaptado de Rishikaysh et al., 2014¹⁰.

Legenda: A unidade pilosebácea compreende o folículo piloso (FP), a glândula sebácea (GS) e o músculo piloerector (MPE). O FP é dividido em partes: o infundíbulo compreende a parte superior da abertura folicular até a inserção da GS; o istmo é delimitado superiormente pela inserção da GS e inferiormente pela inserção do MPE; o bulbo capilar contém a papila dérmica (PD) e as células da matriz (m). A região do bulge (B) está localizada no local de inserção do MPE na BRE. Uma linha pontilhada separa a parte superior permanente da parte inferior transitória. H: haste do cabelo.

A parte superior do FP, permanente, é composta pelo infundíbulo, que se estende da abertura folicular na epiderme até a abertura do ducto sebáceo e corresponde a uma invaginação da epiderme na estrutura folicular. Logo abaixo está o istmo, que contém o *bulge*, delimitado pelo ducto sebáceo e o músculo piloerector⁹.

A parte inferior modifica-se de acordo com as fases do ciclo capilar. A fase anágena representa fase de crescimento ativo e pode durar anos. Inicialmente as células progenitoras do cabelo proliferam, envolvem a papila dérmica em crescimento, crescem em direção inferior e começam a se diferenciar na haste e BRI. A haste recém-formada começa a se desenvolver e os melanócitos localizados na matriz do cabelo mostram atividade melanogênica, pigmentando a haste capilar. Posteriormente há formação do bulbo capilar epitelial em torno da papila dérmica, localizada profundamente no tecido subcutâneo, e a nova haste capilar aparece na superfície da pele. O bulbo capilar é a porção mais inferior do FP, responsável por produzir ativamente o cabelo; envolve os queratinócitos da matriz e a unidade pigmentar do FP e a papila dérmica. A papila dérmica é formada por células com estroma rico em mucopolissacarídeos que se interligam a fibras nervosas e a uma única alça capilar. O tamanho da papila dérmica determina o diâmetro da haste. Além disso, produz de fatores de crescimento essenciais na regulação do crescimento capilar e a melanogênese^{8,9,11}.

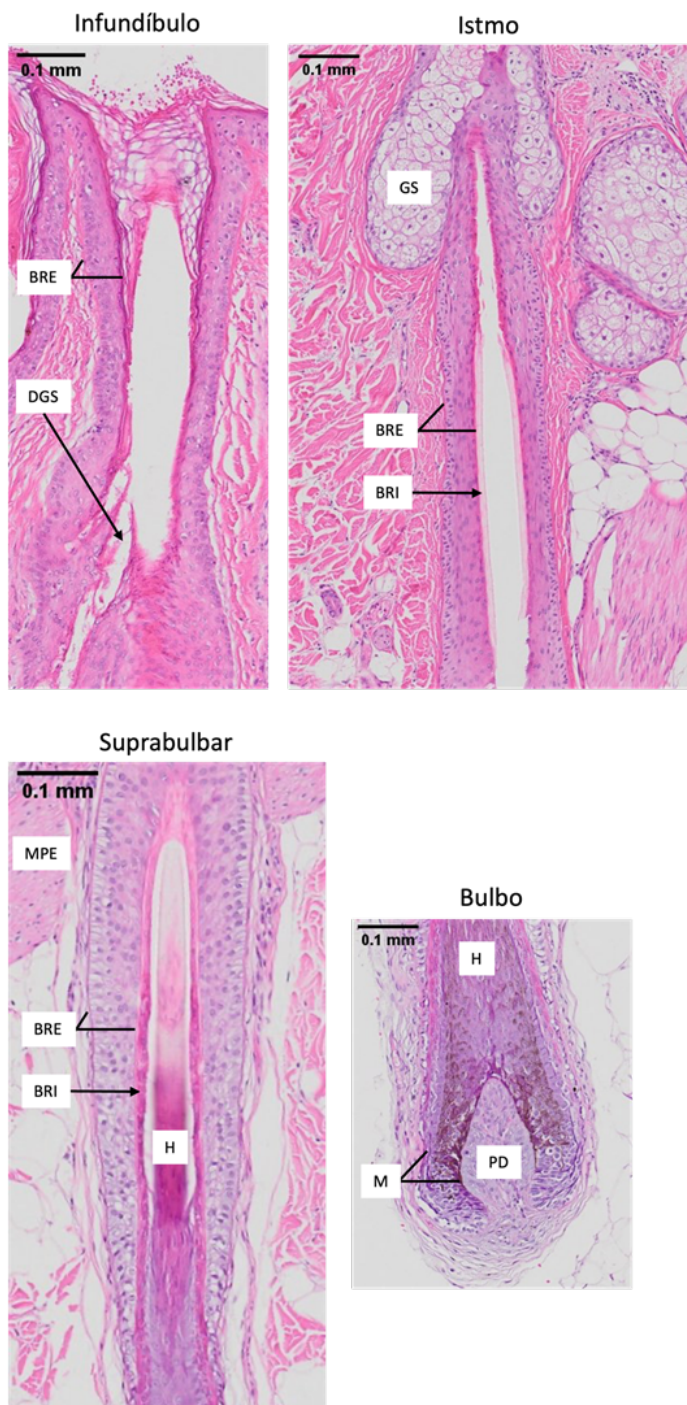
A região que compreende a porção acima do bulbo capilar até o istmo recebe o nome de zona suprabulbar (ou haste, do inglês *stem*). Nesta região as várias camadas concêntricas especializadas do folículo anágeno começam a se diferenciar¹². A figura 2 mostra as partes do FP no exame histológico.

No início da fase catágena, a diferenciação e proliferação dos queratinócitos da matriz capilar diminuem significativamente, a melanogênese é interrompida e cessa a produção da haste. O FP sofre regressão induzida por apoptose e se forma uma estrutura chamada de cabelo em clava. Esta estrutura em clava é caracterizada por uma massa de queratina triquilemal circundada pela BRE e camada vítrea espessada, que ancora a haste no folículo telógeno durante a regressão folicular que possui sentido ascendente. A papila dérmica é transformada em agrupamento de células

quiescentes próximas ao epitélio do FP em regressão e viaja do subcutâneo até a derme profunda. Esta fase dura algumas semanas^{8,9,11}.

Segue a fase telógena, de repouso. Os FP telógenos são caracterizados por ausência de melanócitos produtores de pigmento e de BRI. A papila dérmica fica em repouso, intimamente ligada a uma pequena camada de queratinócitos do germe capilar secundário contendo células-tronco oriundas do *bulge*. No final deste estágio, a haste é despreendida (fase exógena) e em algumas semanas depois o FP entra novamente na fase de crescimento^{8,9,11}.

Figura 2 - Anatomia do folículo piloso em exame histológico



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: BRE: bainha radicular externa, BRI: bainha radicular interna, DGS: ducto da glândula sebácea, GS: glândula sebácea, MPE: músculo piloerector, H: haste, M: matriz, PD: papila dérmica. HE.

3.1.2 Privilégio imune

O termo imunoprivilégio (IP) foi criado por Sir Peter Medawar em 1948¹³ para descrever a proteção à resposta imune inflamatória que as estruturas vitais usufruíam após a inoculação de alotransplantes em certos órgãos, tais como os testículos, a placenta, o cérebro e o olho. Esta definição foi posteriormente estendida para refletir um estado de supressão imunológica mantido por complexos mecanismos específicos a cada tecido que suprimem a inflamação e promovem a tolerância imunológica. Em 1991, Westgate et al. investigaram a relação entre células imunes, proteoglicanos e distribuição de MHC (*major histocompatibility complex*) de classe I na pele durante o ciclo capilar em camundongos¹⁴. Concluiu-se que no anágeno e telógeno, há ausência de expressão de MHC de classe I na porção inferior do FP. Em oposição, no catágeno, as células epiteliais remanescentes expressam MHC de classe I e um grande número de macrófagos ativados está ao redor dos FP.

Atualmente, o conceito de IP no FP é bem estabelecido. Uma das principais funções do IP é proteger os antígenos gerados durante o anágeno do reconhecimento imunológico e induzir um estado de tolerância periférica sempre que expostos ao sistema imune. Similarmente a outros tecidos de IP, o FP tem expressão diminuída/ausente de MHC classe I e II; deleção de células T auto ou alo-reativas por indução de apoptose via Fas, também conhecido como CD95 (cluster de diferenciação) ou APO-1 (*apoptosis antigen 1*); modulação de sinais coestimulatórios; barreira de matriz extracelular que impede a infiltração por células imunes e produção local de imunossupressores potentes¹⁵. Nos FP humanos, os principais imunomoduladores do IP secretados são: α MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*), TGF β 1/2 (*transforming growth factor β 1/2*), IL (interleucina)-10 e IGF -1 (insulin-like growth fator-1)^{16,17}.

Inicialmente, acreditava-se que o IP do FP fosse restrito ao bulbo anágeno. Porém, ele também se estende ao *bulge* para proteger o reservatório de células-tronco foliculares, necessárias para a regeneração. O *bulge* demonstra expressão aumentada de CD200, uma glicoproteína transmembrana do tipo 1 que interage com

o receptor CD200 para gerar sinais anti-inflamatórios e de tolerância¹⁸. Mais recentemente, demonstrou-se que células mesenquimais do FP, especialmente as da papila dérmica e células da bainha dérmica também exibem características de IP¹⁹.

A perda do IP do FP resultaria em ativação do sistema imunológico contra estruturas do FP, resultando nas alopecias imunomediadas.

3.2 ALOPECIAS CICATRICIAIS PRIMÁRIAS

As alopecias cicatriciais são um grupo diversificado de doenças caracterizadas pela destruição permanente do FP com perda capilar irreversível.

Nas ACP, o FP é o alvo principal da destruição inflamatória. Nas alopecias cicatriciais secundárias, a destruição folicular ocorre acidentalmente, como por exemplo após infecções por dermatófitos, processos infiltrativos, cânceres, trauma, radiação ou queimaduras¹.

As ACP foram classificadas pela NAHRS (*North American Hair Research Society*) de acordo com o tipo celular predominante de infiltrado inflamatório observado nas biópsias de couro cabeludo (quadro 1). A epidemiologia das ACP na população geral é desconhecida¹.

Quadro 1 - Classificação das alopecias cicatriciais primárias segundo a NAHRS
(*North American Hair Research Society*)

Linfocíticas	Lúpus eritematoso cutâneo crônico
	Líquen plano pilar <ul style="list-style-type: none"> • LPP clássico • Alopecia frontal fibrosante • Síndrome de Graham-Little
	Pseudopelada clássica (Brocq)
	Alopecia cicatricial central centrífuga
	Alopecia mucinosa
	Queratose folicular espinulosa decalvante
Neutrofílicas	Foliculite decalvante
	Foliculite/celulite dissecante
Mistas	Foliculite (acne) queloidiana
	Foliculite (acne) necrótica
	Dermatose pustulosa erosiva
Não especificadas	Alopecia cicatricial idiopática com achados clínicos e histopatológicos inconclusivos

Fonte: Adaptado de Olsen et al., 2003¹.

3.3 LÍQUEN PLANO PILAR

3.3.1 Histórico e classificação

Em 1895, Pringle relatou que lesões foliculares eram presentes em pacientes com líquen plano, e denominou esta condição de LPP: tipo folicular de líquen plano cutâneo (LPC). Ele observou um paciente com "placa de líquen plano, do tamanho de meia coroa, no braço direito e faixa de líquen pilar em cada lado do pescoço". Dois anos depois, relatou um caso semelhante e um terceiro caso foi o de um homem de 69 anos que apresentava, além de lesões foliculares nas áreas supraclaviculares, placas semelhantes no couro cabeludo. Durante o acompanhamento, lesões de LPC surgiram na face interna de cada joelho, justificando o diagnóstico original²⁰.

Durante a fase ativa de inflamação, as áreas afetadas do couro cabeludo apresentam sinais inflamatórios, principalmente eritema e descamação peripilares. Na fase tardia da doença, há perda de óstios foliculares com pouca alteração da pele, uma vez que a doença afeta preferencialmente as estruturas foliculares, em geral poupando a região interfolicular^{2,4}.

Segundo a NAHRS, o LPP é dividido em três padrões ou variantes: a forma clássica, a alopecia frontal fibrosante (AFF) e a síndrome de *Graham-Little*¹. A forma clássica é caracterizada por áreas localizadas de alopecia no couro cabeludo, preferencialmente na região parietal ou no vértice, mas que podem afetar qualquer região do couro cabeludo. As placas podem aumentar de tamanho e em número, confluindo em lesões maiores e até comprometerem todo o couro cabeludo. O envolvimento de supercílios e pelos do corpo não é comum. A AFF acomete predominantemente mulheres na pós-menopausa, causando alopecia cicatricial da linha de implantação frontal do couro cabeludo e frequentemente dos supercílios e outros pelos do corpo. Em muitos casos, a AFF também se manifesta com alterações cutâneas como as pápulas da face e líquen plano pigmentoso^{21,22}. A síndrome de *Graham-Little* é uma condição rara que apresenta lesões de LPP no couro cabeludo

associadas à alopecia do corpo, como axilas ou púbis, e lesões tipo queratose pilar disseminadas⁶.

Por terem apresentação clínica, epidemiologia e história natural diferentes, alguns autores consideram controversa a classificação AFF como uma variante clínica do LPP, preferindo considerá-las como entidades distintas²³. A associação entre AFF e LPP foi mencionada em 41 pacientes na literatura, mas o tema é pouco discutido²⁴. No presente trabalho, o termo LPP se refere à forma clássica de apresentação e os demais subtipos são referidos por seus nomes específicos.

Outro ponto de controvérsia na literatura é a relação entre LPP e a pseudopelada de *Brocq* (PPB). PPB é definida clinicamente como áreas de alopecia descontínuas, lisas e em tom de pele sem hiperqueratose folicular ou inflamação perifolicular¹. Baseados em relatos de pacientes que apresentavam lesões no couro cabeludo compatíveis com PPB e lesões de LPC coexistentes e/ou alterações liquenoides na histologia, alguns autores acreditam que a PPB represente um estágio final de várias dermatoses como lúpus eritematoso, LPP, esclerodermia, foliculite inflamatória e foliculose ceratótica. Outros autores sugerem que a PPB é uma entidade distinta²⁵. Ainda não há consenso sobre o tema e a classificação atual manteve a PPB como entidade distinta de LPP¹.

Posteriormente à esta classificação, outras formas clínicas de LPP foram descritas, que se apresentam com um padrão difuso de alopecia cicatricial linfocítica: *Fibrosing alopecia in pattern distribution*²⁶, *Cicatricial pattern hair loss*²⁷, *Lichen planopilaris diffuse pattern*²⁸.

3.3.2 Epidemiologia

O LPP é uma doença incomum e sua real prevalência é desconhecida. Em muitos artigos os casos de AFF e LPP são descritos como um grupo único o que torna a caracterização epidemiológica menos precisa^{29,30}. Nas maiores séries de casos a

idade de início varia de 25 a 70 anos; sendo a maioria mulheres caucasianas no início dos cinquenta anos^{6,31-33}.

Recentemente um estudo retrospectivo da cidade de Nova Iorque estimou prevalência de 0,017% de LPP e 0,015% de AFF³⁴. Outro estudo obteve, através de banco de dados do *National Institute of Health* dos Estados Unidos, uma estimativa de 0,043% de LPP incluindo AFF³⁵. Um estudo coreano obteve prevalência de 0,005% de LPP, ainda menor do que os estudos americanos, porém, com significativo aumento nas últimas décadas³⁶.

Há poucos dados sobre possíveis diferenças raciais. Em um estudo chileno, o LPP predominou em mulheres, mas os homens acometidos apresentavam idade de início significativamente menores³⁷. Todos os estudos confirmam que o LPP é mais prevalente em mulheres acima dos 50-60 anos.

Um estudo de 2008 avaliou a porcentagem de LPP em novas consultas em quatro centros de referência de doenças de cabelo dos Estados Unidos num período de 1 ano; a incidência anual de LPP variou de 1,15% a 7,59% e o LPP foi a causa de alopecia cicatricial em até 25% dos pacientes³⁸. Já em outro estudo de 2019, que incluiu 22 serviços referenciados especializados em doenças de cabelo do mundo, o LPP foi responsável por 7,6% de todos os diagnósticos³⁹.

LPP em criança é considerado raro e poucos casos foram relatados na literatura. Em estudos de líquen plano em crianças, a forma LPP variou de 0% a 11,7%⁴⁰.

3.3.3 Aspectos clínicos e história natural da doença

O LPP clássico apresenta-se como áreas de alopecia multifocais, coalescentes, tipicamente no vértice e regiões parietais. Na periferia das áreas alopécicas, que correspondem às margens de expansão da doença, há graus variados de eritema e descamação perifolicular como mostra a figura 3. Estes sinais

também podem estar presentes em outras áreas do couro cabeludo que não apresentam perda capilar^{6,41}. Pústulas são infrequentes no LPP e podem mimetizar foliculite decalvante e outras formas de alopecia neutrofílica⁴². Sintomas como prurido, queimação ou dor e o teste de tração positivo com desprendimento de fios anágenos são associados à maior atividade inflamatória.

Figura 3 - Quadro clínico do líquen plano pilar – forma clássica



Fonte: Departamento de Dermatologia - HCFMUSP.

Legenda: Área de alopecia cicatricial, com eritema e descamação peripilares nas margens.

O curso do LPP é imprevisível. Alguns pacientes mantêm perda capilar lentamente progressiva com períodos de maior atividade; outros podem ter rápida progressão, acompanhada ou não de sinais inflamatórios e sintomas, alternando com períodos de remissão^{6,41}.

Geralmente apenas o couro cabeludo é afetado, mas o LPP também pode acometer os pelos da face⁴³ e corpo⁴⁴⁻⁴⁷.

Associação da forma clássica de LPP com outros subtipos como LPC e líquen plano oral (LPO) é frequentemente descrita²⁵. Em uma série de 45 pacientes de LPP, 50% apresentavam envolvimento concomitante da mucosa e/ou da pele, que, na maioria dos casos, se desenvolveu após o início da perda capilar⁴⁸. Em outras séries, a associação com outras formas de líquen plano é menos frequente^{6,41,44}. Em um estudo de 584 casos de LPO, apenas 6 tinham LPP associado⁴⁹, em outra série de casos de pacientes com líquen plano vulvovaginal-gengival, 75% apresentavam lesões no couro cabeludo compatíveis com LPP⁵⁰.

3.3.4 Tricoscopia

A tricoscopia é um método para visualização das estruturas das hastes e do couro cabeludo através do emprego de aparelhagem ótica que permite um aumento variável de 6 a 1000x. O método foi primeiramente desenvolvido para capilaroscopia e análise de lesões pigmentadas cutâneas, principalmente para detecção precoce de melanoma. Nas alopecias e distúrbios do couro cabeludo, a tricoscopia aumenta a capacidade de diagnóstico, quando comparada à inspeção clínica simples a olho nu, e é considerada indispensável na avaliação destes pacientes⁵¹. A tricoscopia também é ferramenta útil na seleção dos locais para a biopsia de couro cabeludo, pois identifica as áreas com sinais característicos da doença⁵².

Todas as alopecias cicatriciais, primárias ou secundárias, terão, à tricoscopia, diminuição da densidade capilar e ausência de aberturas foliculares, já que os folículos são substituídos por fibrose⁵¹. No LPP a tricoscopia revela pontos brancos grandes, irregulares e mal delimitados, correspondentes à fibrose, sobre áreas vermelho-leitosas. Ocasionalmente é possível observar pontos castanhos ou azuis acinzentados perifoliculares, que correspondem à incontinência pigmentar, secundária a inflamação na junção dermoepidérmica ao redor dos pelos⁵³, e vasos sanguíneos lineares alongados^{51,54}.

Nas margens das áreas alopécicas a tricoscopia mostra eritema do couro cabeludo tanto difuso quanto perifolicular e descamação branco-prateada ao redor dos pelos que caracteristicamente abraça os fios até alguns milímetros acima da superfície do couro cabeludo e é melhor vista sem líquido de contato (figura 4). Alguns fios distróficos, denominados *pili torti* adquiridos e pequenos tufos, agrupamentos de 5 a 9 hastes, podem estar presentes (figura 5), assim como fios quebrados, pontos pretos e rede vascular irregular^{51,54}.

Figura 4 - Tricoscopia do liquen plano pilar: ausência de óstios foliculares, descamação peripilar, pontos castanhos dispersos, haste distrófica e vasos sanguíneos irregulares



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: Área de alopecia sem visualização de óstios foliculares, descamação peripilar, pontos castanhos dispersos, haste distrófica e vasos sanguíneos irregulares.

Figura 5 - Tricoscopia do liquen plano pilar: eritema difuso, descamação peripilar, pequenos tufos e pústulas



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: Eritema difuso, descamação peripilar, pequenos tufos e raras pústulas na margem da área alopecica, localizada no canto superior direito, onde não há visualização de óstios foliculares.

3.3.5 Comorbidades

Apesar de um estudo ter concluído que o LPP é associado a menor risco de hipotireoidismo⁵⁵, na maioria das publicações o LPP é associado a um risco maior de hipotireoidismo⁵⁶⁻⁵⁹. Outras doenças autoimunes como doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico mostraram correlação positiva em um trabalho que avaliou LPP incluindo todas as suas variantes^{58,59}, mas não foram relacionadas em estudo que avaliou o LPP clássico isoladamente⁵⁷.

A associação com deficiência de vitamina D^{57,59,60}, depressão^{57,58}, ansiedade^{57,58} e distúrbios do sono^{57,58} teve resultados conflitantes nos estudos, assim como a associação com hiperlipidemia, hipertensão e doença cardíaca isquêmica,

que permanece controversa^{29,55,58,59}. Em alguns estudos, diabetes mellitus tipo 2 mostrou correlação negativa com LPP^{57,61}.

Quanto a doenças dermatológicas, o LPP foi associado à psoríase^{55,58,59,61}, rosácea^{29,58}, dermatite atópica^{58,59} e aos cânceres de pele (carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas e melanoma)^{29,58,59}, sendo estes últimos não associados em outro estudo⁵⁷.

A tabela 1 resume as comorbidades investigadas nos pacientes com LPP (compreendendo todos os subtipos) nos estudos caso-controles publicados.

Em uma série de 70 pacientes femininas com diagnóstico de LPP, 14,3% apresentavam hirsutismo e 40% síndrome dos ovários policísticos ou excesso de androgênios, diagnosticado por dosagens laboratoriais de testosterona total, testosterona livre, porcentagem de testosterona livre, sulfato de desidroepiandrosterona e androstenediona, porém sem comparação com grupo controle⁶¹. A associação com hirsutismo também foi descrita em outro estudo⁵⁷.

Tabela 1 - Comorbidades associadas a Líquen plano pilar

Referência	Brankov et al., 2018 ⁵⁷	Fertig et al., 2018 ⁵⁵	Manatis-Lornell, et al., 2020 ²⁹	Trager et al., 2021 ⁶¹	Joshi et al., 2022 ⁵⁸	Lim et al., 2023 ⁵⁹
Fonte de dados	Cleveland Clinic Foundation	Riyadh, Saudi Arabia & Miami, EUA	Massachusetts General Hospital	Columbia University Irving Medical Center	All of Us database	Coréia
Arite Reumatóide	0	NA	0	0	+	+
Lúpus eritematoso sistêmico	0	+	0	+	+	+
Diabetes tipo 1	NA	NA	0	0	0	NA
Colite Ulcerativa	0	NA	NA	0	NA	+
Vasculite	NA	NA	0	NA	NA	Behçet 0
Esclerose múltipla	NA	0	0	0	NA	0
Sd Sjogren	NA	NA	0	0	NA	0
Doença de Crohn	NA	0	NA	0	+	0
Outras			Polimialgia reumática 0			Espondilite anquilosante 0
Hipotireoidismo *	+	0	0	+	+	+
Hipertireoidismo	NA	0	0	0	0	+
Tireoidide de Hashimoto	+	NA	0	0	NA	+
outras doenças da tireoide	0	NA	0	NA	NA	NA
Rosácea	NA	NA	+	NA	+	NA
Psoríase	0	0	NA	+	+	+
Vitiligo	0	0	NA	+	0	NA
Líquen Plano	NA	NA	NA	+	NA	+
Alopecia areata	NA	0	0	NA	NA	NA
CPNM	NA	0	+	NA	+	+
Melanoma	NA			NA	+	0
Dermatite atópica	0	NA	NA	0	+	+
Rinite alérgica	+	0	NA	0	NA	+
Asma	0	NA	NA	0	NA	0
Obesidade	0	NA	NA	NA	+	+

Continua

Conclusão

Referência	Brankov et al., 2018 ⁵⁷	Fertig et al., 2018 ⁵⁵	Manatis-Lornell, et al., 2020 ²⁹	Trager et al., 2021 ⁶¹	Joshi et al., 2022 ⁵⁸	Lim et al., 2023 ⁵⁹
Insuficiência cardíaca	NA	-	-	NA	+	0
Hipertensão	NA	-	0	NA	+	+
Hiperlipidemia	+	0	0	NA	+	+
Diabetes tipo 2	+	-	NA	-	0	+
Cardiopatía isquêmica	NA	-	0	NA	0	0
AVC	NA	NA	-	NA	NA	0
Outros		Esteatose hepática 0 DPOC 0	Glaucoma -			Doença arterial periférica 0
Anemia	0	NA	NA	NA	NA	0
Deficiência de Ferro	0	NA	NA	NA	NA	+
Deficiência de Vitamina D **	+	NA	NA	NA	NA	+
Alcoolismo	NA	NA	NA	NA	0	-
Ansiedade	+	NA	0	NA	+	Distúrbios do humor+
Depressão	+	0	0	NA	+	
Insônia	+	0	NA	NA	+	NA
Dependência à nicotina	NA	NA	NA	NA	0	-
Hiperparatireoidismo	0	NA	0	NA	NA	NA
Sd dos ovários policísticos	NA	NA	0	NA	NA	NA
Hirsutismo	+	NA	NA	NA	NA	NA
Hepatite C	NA	0	0	NA	NA	NA
Doença celíaca	0	NA	0	0	NA	NA
Outros	Sarcoidose 0	Malignidades 0	Fibrose uterina 0	NA	HIV 0	

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: *Hipotireoidismo foi associado positivamente em um estudo que avaliou doenças de tireoide em Cleveland Clinic Foundation (Mesinkovska et al., 2014⁵⁶).

**Deficiência de vitamina D foi associada positivamente em um estudo sobre deficiência de vitamina D (Shaheir et al., 2022⁶⁰). + correlação positiva; - correlação negativa; 0 sem correlação; NA não avaliado; CPNM: Câncer de pele não melanoma; AVC: acidente vascular cerebral; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica.

3.3.6 Etiopatogenia

Apesar da etiopatogenia do LPP não ser totalmente elucidada, admite-se que os possíveis desencadeantes da doença tenham como via comum o colapso do IP do nicho de células-tronco epiteliais dos FP⁶³. Demonstrou-se que no LPP há uma inversão do perfil associado ao IP, com expressão aumentada de MHC classe I e II, β 2microglobulina e expressão reduzida de TGF- β 2 e CD200. Em conjunto, há aumento de células T e células dendríticas plasmocitoides, e expressão aumentada de quimiocinas induzidas por interferon (CXCL9, 10, 11)⁶³.

Em situações de normalidade, as células do *bulge* encontram-se em estado quiescente e podem ser ativadas para proliferarem durante o início do anágeno. As células-tronco são essenciais para o ciclo capilar e fornecem as células diferenciadas que formarão a BRI, córtex e medula⁶⁴. Sem elas o FP perde o potencial de crescimento, entra no estágio de catágeno e involui com formação de tratos fibróticos, que caracterizam a alopecia cicatricial⁶⁵.

O mecanismo da perda de células-tronco foliculares ocorre via transição epitelial para mesenquimal (TEM). Este é um processo fisiológico em que as células epiteliais assumem gradualmente uma morfologia semelhante a fibroblasto que ocorre durante a embriogênese e cicatrização de feridas, mas que foi identificado também em processos patológicos, como a transformação maligna de células epiteliais, metástase de carcinoma e várias doenças fibróticas⁶⁶.

O evento inicial da perda do IP permanece desconhecido, embora os possíveis desencadeadores incluam trauma cutâneo, superantígenos bacterianos, estressores infecciosos ou psicoemocionais^{67,68}. Relatos de pacientes que desenvolveram LPP induzido por tração e pós cirurgia de transplante capilar^{69,70} são particularmente valorizados, pois sugerem que haja fenômeno de Koebner, também chamado de reação isomórfica: desenvolvimento de lesões características de uma doença particular ocorrendo no local do trauma físico ou algum outro estímulo nocivo, típico de LPC⁷¹.

No LPP, os desencadeantes ambientais eram considerados pouco relevantes até o surgimento da AFF. A crescente incidência e a predominância em mulheres na pós-menopausa estimularam a procura por possíveis desencadeantes ambientais, sendo o protetor solar e seus componentes os mais estudados. Entretanto, até o momento não há evidências suficientes para estabelecer uma relação causal direta⁷².

Dentre os outros desencadeantes propostos na literatura destacam-se os defeitos primários no funcionamento do PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), cuja expressão tecidual está diminuída em lesões de LPP⁷³. O PPAR γ é um fator de transcrição que regula o metabolismo lipídico e biogênese de peroxissomas, organelas semelhantes aos lisossomos, responsáveis pela eliminação celular de determinados resíduos tóxicos. A disfunção de PPAR γ levaria à perda progressiva de peroxissomos e conseqüentemente, haveria acúmulo de lipídios pró-inflamatórios e infiltração de células inflamatórias seguida de destruição da unidade pilossebácea⁷³⁻⁷⁵.

Outras vias foram implicadas na etiopatogênese de LPP e AFF. Uma delas é a via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) que possui efeitos no sistema imunológico e na proliferação de células-tronco. As proteínas desta via estão presentes em FP normais e exibem expressão alterada nos pacientes⁷⁶. Outro estudo reportou aumento da expressão do receptor de hidrocarboneto arílico, que tem alta afinidade para as dioxinas, poluentes orgânicos persistentes e subprodutos da atividade industrial⁷⁷. As vias de inflamação neurogênica também foram investigadas, e alterações na expressão de neuropeptídeos como a substância P e peptídeo associado ao gene da calcitonina foram associados ao LPP e à AFF⁷⁸.

Recentemente, estudos para identificação de assinaturas de expressão gênica implicaram vias associadas à ativação de mastócitos, além da diminuição da colesterogênese, aumento da expressão de genes associados à fibrose e à inflamação do eixo Th (T *helper*) 1: CD4, IFN- γ (*interferon-gama*), STAT4 (*signal transducer and activator of transcription 4*), e IL-12⁷⁹. Segundo os autores, os mastócitos podem ser o elo entre a resposta imune inata, potencialmente envolvendo mecanismos alérgicos, e as células Th1. Além disso, por expressarem o receptor de IL-23, admite-se que os mastócitos sejam produtores de IL-17A e IL-23^{79,80}. Isto

poderia estar relacionado com a expressão de IL-17 na área de fibrose perifolicular em amostras de LPP⁸¹.

A importância da predisposição genética no LPP foi pouco explorada. Em um estudo com pacientes judeus não Ashkenazi, população que parece ter aumento da prevalência de LPP, encontrou-se maior frequência dos alelos HLA DRB1*11 e DQB1*03 nos doentes⁸². Casos familiares de LPP também foram descritos⁸³.

3.3.7 Histopatologia

A histologia é a mesma em todos os subtipos de LPP, e se caracteriza por infiltrado liquenoide de células T ao redor do FP, especificamente à região do istmo, onde está localizado o *bulge*, local de reservatório de células-tronco foliculares, (figura 6) além de fibrose perifolicular concêntrica, perda das glândulas sebáceas e nas fases tardias, e substituição dos folículos por tratos fibrosos cicatriciais^{32,48}. Um grande número de mastócitos também pode ser detectado nas lesões ativas de LPP^{79,80}. Quando a histologia não mostra achados específicos, a coloração para fibras elásticas Verhoeff-Van Gieson pode ser útil por mostrar padrão de elastólise em forma de cunha nos casos de LPP⁸⁴.

Em FP anágenos humanos normais, as células de Langerhans, células T CD4+ e células T CD8+ estão presentes e concentradas principalmente no infundíbulo, provavelmente com função de vigilância na região que é mais exposta ao meio externo. A proporção de CD4:CD8 mostrou ser 2:1 em FP normais⁸⁵. No LPP o papel das células de Langerhans ainda é controverso. As células de Langerhans no LPP foram relatadas como diminuídas^{65,86,87} e aumentadas⁸⁸.

Em adição à histopatologia, a IFD pode ser usada como ferramenta diagnóstica. Os padrões de IFD característicos de LPP são depósitos globulares de imunoglobulinas, principalmente IgM (Imunoglobulina M), depósitos de C3 (componente 3 do complemento) e fibrinogênio localizados na derme papilar

adjacente à junção dermoepidérmica. Ocasionalmente, observam-se depósitos globulares na BRE, e banda difusa de fibrina ao longo da junção dermoepidérmica e ao redor dos FP⁸⁹. Estes padrões mostraram uma sensibilidade de 34% e uma especificidade de 95% em LPP⁸⁹. Segundo os autores do estudo, o método é útil numa pequena porcentagem de casos em que a histopatologia não é suficiente para o diagnóstico, particularmente no diferencial com lúpus eritematoso.

Figura 6 - Exame anatomopatológico do líquen plano pilar



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: Exame anatomopatológico de líquen plano pilar, corte vertical. infiltrado linfo-histiocitário ao redor do istmo do folículo piloso, região delimitada pela abertura do ducto sebáceo e a inserção do músculo piloerector (não mostrado na figura). Hematoxilina e eosina.

3.3.8 Tratamento

O objetivo do tratamento é diminuir ou estabilizar a progressão da doença e aliviar sintomas e sinais inflamatórios. Assim, as expectativas do tratamento devem ser esclarecidas aos doentes, já que a repilação das áreas alopecicas não é esperada⁶.

A qualidade da evidência do tratamento de LPP é baixa. A maioria dos estudos consiste em relatos de casos retrospectivos, pequenas séries e opinião de especialistas (nível de evidência III e IV)⁹⁰. Os métodos de avaliação disponíveis como fotografias, tricoscopia, contagem de cabelos ou escores de pontuação, muitas vezes não são padronizados, o que dificulta a comparação entre os estudos⁶. A evolução natural do LPP é amplamente variável e a estabilização espontânea pode ser um grande confundidor⁹¹. Ademais, em um pequeno estudo prospectivo foi relatado que pacientes considerados bons respondedores à terapia por avaliação clínica, na verdade tiveram progressão da perda capilar quando mensurada por contagens de cabelo em fotos com dispositivo estereotáxico⁹². Isto posto, a progressão da doença não parece se correlacionar completamente com os sintomas e os sinais visíveis de inflamação.

Até o momento, as terapias para o LPP baseiam-se em drogas imunossupressoras e/ou moduladoras pouco específicas. Uma revisão sistemática de 2013 sobre o tratamento da AFF e LPP concluiu que para pacientes de LPP a ciclosporina oral é a droga mais eficaz, seguida dos corticosteroides sistêmicos⁹⁰. Os corticosteroides tópicos e hidroxicloroquina oral também tiveram bons resultados. Do total de 228 pacientes, 150 (65,8%) receberam corticosteroides tópicos (79 pacientes) ou hidroxicloroquina oral (71 pacientes, em 22 casos em combinação com corticosteroides tópicos). Houve boa resposta clínica em 53% e 23%, respectivamente (nível de evidência 4). Dos 38 pacientes que receberam ciclosporina oral ou corticosteroides sistêmicos, cerca de 60% apresentaram boa resposta clínica; entretanto, alguns autores descrevem uma taxa de recidiva de 40% com estes tratamentos (nível de evidência 4). Cerca de um terço dos pacientes tratados

apresentou boa resposta clínica à tetraciclina ou doxiciclina oral, ao micofenolato de mofetil oral e às preparações de corticosteroides intralesionais (nível de evidência 4)⁹⁰.

Mais recentemente, um estudo retrospectivo analisou o tratamento de 90 pacientes que em sua maioria receberam hidroxicloroquina como primeira linha de tratamento, seguido de metotrexate e micofenolato mofetil. A porcentagem de pacientes que descontinuaram o tratamento, tanto por falha terapêutica quanto por efeitos colaterais, foi de 26% com hidroxicloroquina, 31% por metotrexate e 53% por micofenolato mofetil⁹³. Outro estudo comparou o tratamento de dois grupos de LPP que receberam 15 mg de metotrexato por semana, sendo um grupo associado a 200 mg de prednisolona. Não houve diferença na melhora do LPPAI, em sintomas e avaliação fotográfica entre os grupos após 6 meses⁹⁴.

Após os estudos sobre a diminuição da expressão de PPAR γ no LPP, investigou-se o potencial terapêutico da pioglitazona, um agonista do receptor de PPAR γ habitualmente utilizado para tratamento de diabetes por aumentar a resistência periférica à insulina. Um ensaio clínico randomizado comparou a eficácia e segurança de pioglitazona 15mg/d com clobetasol 0,05% tópico uma vez ao dia por 6 meses. Ambos diminuíram sinais e sintomas no tempo de acompanhamento, sem diferença entre os grupos. A pioglitazona foi considerada associada à boa resposta em 15% e a resposta parcial 60% com poucos efeitos colaterais⁹⁵. Outras publicações relatam séries de casos com resultados variáveis de eficácia e de efeitos colaterais da pioglitazona⁹⁶⁻⁹⁹.

Transplante capilar para LPP é viável, porém não recomendado pelo risco de perda de enxertos transplantados e recorrência da doença. São poucas as publicações, sem padronização no acompanhamento dos casos^{100,101}. Além disso, o viés de publicação de resultado positivo deve ser considerado alto.

Outros tratamentos relatados na literatura com resultados variáveis são: naltrexone, um antagonista opioide com ação imunomoduladora^{102,103}, inibidores das *Janus Associated Kinases* (JAK) orais e tópicos como tofacitinibe¹⁰⁴ e baricitinibe¹⁰⁵,

terapia a laser de baixa intensidade¹⁰⁶, terapia com luz de baixa intensidade¹⁰⁷, terapia com plasma rico em plaquetas^{108,109}.

3.4 TOLL- LIKE RECEPTORS

3.4.1 Introdução

A pele, as mucosas e o FP são estruturas de barreira contra o meio externo e assim, a primeira interface do sistema imunológico com os microrganismos. São órgãos providos de diversos mecanismos da imunidade inata e da imunidade adaptativa que interagem entre si para a proteção contra os patógenos invasores.

Um dos componentes da imunidade inata são os chamados *pattern recognition receptors*, receptores capazes de reconhecer moléculas com conformações específicas, padrões moleculares encontrados nos patógenos e ausentes nas células humanas. A principal família destes receptores são os TLRs. Os TLRs representam uma família de glicoproteínas transmembrana altamente conservadas através da evolução e podem ser encontrados em diversas espécies. Em humanos foram descritos 10 receptores desta família. Cada subtipo de TLR exhibe um padrão de expressão peculiar e responde a sinais específicos. Seis estão localizados na membrana celular, para contato com o meio externo (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) e 4 em organelas intracelulares como retículo endoplasmático e endossomos para contato com invasores intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9). Os ligantes ativadores desses receptores são de diversas naturezas como lipídeos, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos. Alguns TLRs associam-se com outros formando homo ou heterodímeros, o que aumenta a especificidade dos receptores para detectar diferenças sutis dos componentes microbianos^{110,111}.

Os TLRs reconhecem assinaturas moleculares específicas de micróbios conhecidas como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e moléculas

autoderivadas provenientes de células danificadas, chamadas de DAMPs (*damage-associated molecules patterns*) por ex. HMG-B1 (*high-mobility group box1*), proteínas de choque térmico e fibrinogênio. Após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs, os TLRs recrutam proteínas adaptadoras como MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) e TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), que iniciam vias de transdução de sinal que culminam na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), IRFs (*interferon regulatory factors*) ou MAP (*mitogen-activated protein*) quinases para regular a expressão de citocinas, quimiocinas e IFN tipo I^{110,112}. Os TLRs regulam a ativação de células apresentadoras de antígenos, assim como regulam a ativação, o crescimento, a diferenciação, e o desenvolvimento e a função das células T, sendo uma ponte entre a imunidade inata com a adaptativa¹¹¹.

Os TLRs são expressos em todo tecido linfóide, principalmente em leucócitos do sangue periférico, monócitos, linfócitos B e T, granulócitos e células dendríticas, mas também estão presentes em células não linfóides, como células epiteliais intestinal, pulmonar e renal, diferentes células do sistema nervoso central, cardiomiócitos e fibroblastos sinoviais.

Além da função de proteção contra organismos invasores, a interação destes receptores com a microflora comensal é importante para a manutenção da homeostase¹¹³. Disfunções na via de sinalização são associadas a doenças autoimunes, inflamatórias crônicas, alérgicas e neoplasias¹¹¹.

Na pele, os TLR são expressos nos queratinócitos, células de Langerhans e melanócitos e na derme nos macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células B e T, células endoteliais, adipócitos e fibroblastos¹¹². O quadro 2, traduzido e adaptado de Kumar 2021 resume os TLRs expressos nas células da pele humana, sua localização e seus ligantes PAMPs e DAMPs¹¹⁴.

Os TLRs foram estudados em diversas patologias dermatológicas como acne, rosácea, psoríase, dermatite atópica, pênfigo foliáceo, sífilis, hanseníase, infecções por *Staphylococcus aureus*, dermatófitos, cândida, herpes simples e varicela zoster^{112,114,115}.

Quadro 2 - TLRs expressos em células da pele humana, sua localização, PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e DAMPs (*damage-associated molecular patterns*)

TLRs	Localização celular do TLR	PAMPs	DAMPs	Células cutâneas que expressam TLRs
TLR1	Membrana plasmática	Fatores solúveis de triacil lipopeptídeo	Desconhecido	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos, melanócitos
TLR2	Membrana plasmática, fagossomos	Peptideoglicano, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, zimosan, LPS atípicos	Hsp60, 70 e gp96, e ácido hialurônico, amiloide A sérico, HMG-B1, versican, MMP2, PAUF	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos, melanócitos
TLR3	Endossomos e endolisossomos	RNA de fita dupla	RNA mensageiro	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos, melanócitos
TLR4	Membrana plasmática, fagossomos	LPS, taxol, proteína de fusão, proteínas de envelope	Hsp60, 70, fibronectina tipo III, gp96, ácido hialurônico, heparina sulfato, fibrinogênio, SAA, HMB-B1	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos, melanócitos
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	HMG-B1	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos
TLR6 /TLR4	Membrana plasmática, fagossomos	Di-acil lipopeptídeos	Amiloide beta e LDL oxidado	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos
TLR7	Endossomos, endolisossomos e lisossomos	RNA de fita simples de formato viral	RNA fita simples (complexo imune)	Fibroblastos, células de Langerhans, melanócitos, ativação de TLR3 induz expressão de TLR7 em queratinócitos
TLR8	Endolisossomos	RNA fita simples	RNA fita simples	Fibroblastos, células de Langerhans
TLR9	Endossomos, endolisossomos, lisossomos e fagossomos	citidina-fosfato-guanisina oligodeoxinucleotídeos, DNA de fita dupla, hemozoína	DNA do hospedeiro de células em morte celular, DNA mitocondrial, complexo HMG-B1-DNA	Fibroblastos, células de Langerhans, queratinócitos, melanócitos
TLR10	Endolisossomos	HIV-1 gp41	Desconhecido	Fibroblastos, células de Langerhans

Fonte: Adaptado de Kumar, 2021¹⁴.

Legenda: DNA: ácido desoxirribonucleico, Hsp: heat shock proteins, HMG-B1: high mobility group box 1, HIV: vírus da imunodeficiência humana, LPS: lipopolissacarídeos, LDL: low-density lipoprotein, MMP2: Matrix metalloproteinase, PAUF: pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor, RNA: *Ribonucleic acid*.

3.4.2 Os TLRs e as doenças liquenoides

A relação dos TLRs com doenças liquenoides como LPC e LPO foi investigada em alguns artigos (quadro 3). Nas lesões de pele de LPC, a expressão de TLR1 e TLR2 se mostrou diminuída e com padrão de expressão diferente dos controles¹¹⁶. Um outro estudo revelou valores significativamente menores por *western-blot* de TLR7 em comparação com os controles, independente de apresentarem diagnóstico de hepatite C¹¹⁷. Em um trabalho com células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LPC, a estimulação com ligantes de TLRs extracelulares (TLR2, TLR4, TLR5) induziu uma produção elevada de TNF (*tumor necrosis factor*), em oposição à estimulação dos TLRs intracelulares (TLR3, TLR7 e TLR9), resultando em importante redução desta citocina. Contudo, a estimulação via TLR7/TLR8 foi capaz de restaurar a produção de TNF, sugerindo que a via TLR8 é funcional no LPC¹¹⁸. O mesmo grupo, no ano seguinte, provou que a ativação das vias de TLR4, TLR7, TLR7/TLR8 e TLR9 induzem a produção de células dendríticas mieloides pro inflamatórias, células T reguladoras e efectoras em pacientes com LPC, demonstrando ativação tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa via TLRs¹¹⁹.

No LPO os estudos mostram resultados diversos¹²⁰. A expressão de TLR2 foi a mais estudada e foi reportada como aumentada na mucosa de LPO¹²¹, além de presente em monócitos teciduais e do sangue periférico¹²¹. Em um estudo concordante, houve aumento da expressão de TLR2 no grupo de LPO fumante sobre o grupo de LPO não tabagista, além do aumento da expressão de TLR2 em pacientes de LPO comparado aos controles¹²². Em um estudo com cocultura de queratinócitos de LPO com *C. albicans* foi demonstrado aumento de mRNA (*messenger ribonucleic acid*) de TLR2 em relação a controles¹²³. Em outro estudo, o estímulo com lipopolissacarídeos (LPS) ativou a resposta Th17/Treg através da via TLR4/NF-κB em células T de sangue periférico de pacientes com LPO¹²³. Por outro lado, também há descrição na literatura de diminuição da expressão de TLR2 em LPO¹²⁵.

A expressão de TLR4 em LPO foi reportada como aumentada¹²⁵⁻¹²⁷, assim como a de TLR9¹². Zeng et. al (2018) demonstraram aumento da expressão de TLR4

in situ, e que o estímulo de TLR4 através de LPS induz a produção excessiva de quimiocinas, e que o bloqueio de TLR4 através do inibidor TAK-242 elimina a expressão de CCL2¹².

Em investigação sobre o infiltrado inflamatório de LPO, observou-se maior presença de células positivas para TLR4, sem diferença de células positivas para TLR2 e 8 e diminuição de positividade para TLR3. Os autores concluíram que a expressão gênica de proteínas associadas à sinalização mediada por TLRs encontra-se diminuída¹².

Pelo método de *microarray*, a expressão dos genes para TLR1, 2, 3, 5, 6 e 10 foi descrita como aumentada em tecidos de LPO em relação à mucosa normal enquanto a razão dos genes para TLR7, 8 e 9 estava diminuída. A razão média do gene para TLR4 não diferiu da mucosa normal¹². Em contrapartida, um estudo com qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) e IHQ reportou aumento da expressão de TLR7, 8 e 9¹²⁹.

Um polimorfismo do gene de TLR3 foi associado a risco aumentado de LPO¹³⁰ e posteriormente foi associado à malignização de LPO¹³¹.

Quadro 3 - Artigos de investigação de TLRs em líquen plano cutâneo e líquen plano oral

	Referência	Amostra	Métodos	Resultados
LP cutâneo	Salem; Abu-Zeid; Nada, 2013 ¹¹⁶	biópsias de pele de 30 LPC e 15 CS	IHQ	↓ TLR1 e TLR2 e mudança de padrão de expressão
	Tawdy; Rashed, 2012 ¹¹⁷	biópsias de pele de 20 LPC e 10 CS	WB e RT-PCR	↓ TLR7
	Domingues et al., 2015 ¹¹⁸	culturas de PBMC de 20 LPC e 24 CS	CF	agonistas de TLRs extracelulares (TLR2, TLR4, TLR5) ↑ TNF-α agonistas de TLRs intracelulares (TLR3, TLR7 e TLR9) ↓ TNF-α, IL-1β e IL-6
	Domingues et al., 2016 ¹¹⁹	culturas de PBMC de 18 LPC e 22 CS	CF	agonistas de TLR4, TLR7, TLR7/TLR8 e TLR9 ↑ mDCs pro inflamatórias, Tregs e células T multifuncionais
LP oral	Ohno et al., 2011 ¹²⁰	tecido de 10 LPO e 5 CS	cDNA <i>microarray</i>	de 10 genes de TLRs: ↑TLR1, 2, 3, 5, 6 e 10 ↓TLR7, 8 e 9
		tecido de 10 LPO e 5 CS	RT-PCR	TLR2 ↑ em 06/10, TLR4 ↑ em 4/10, ↓ em 4/10
		biópsias de mucosa de 32 LPO e 5 CS	IHQ	↑ TLR2 mucosa e monócitos, sem ≠ TLR4
		PBMC de 10 LPO e 5 CS	CF	↑ TLR2 sem ≠ TLR4
	Janardhanam et al., 2012 ¹²⁵	tecido de 10 LPO e 10 CS	IHQ	↓ TLR2 ↑TLR4
		saliva e cultura de células epiteliais da mucosa oral de 25 LPO e 25 CS	qPCR	↓ TLR2 ↑TLR4 mRNA
	Siponen et al., 2012 ¹²⁶	tecido de 50 LPO e 5 CS	IHQ	↑TLR4 (camada basal) e ↑ TLR9 (camada superficial)
	Liu et al., 2018 ¹²³	cocultura de queratinócitos de 9 LPO e <i>C. albicans</i>	WB e RT-PCR	↑TLR2 proteína e mRNA em relação a cultura isolada de queratinócitos de LPO
	Wang et al., 2018 ¹²⁹	sangue e tecido de 23 LPO e 9 CS	IHQ e qPCR	↑TLR7, TLR8 e TLR9
	Zeng et al., 2018 ¹⁷⁶	tecido de 20 LPO e 8 CS	IHQ e RT-PCR	↑TLR4
Amin; Yussif; Ahmed, 2020 ¹²²	tecido de 20 LPO fumantes, 20 LPO não fumantes, 20 CS	IHQ	↑ TLR2 fumantes > não fumantes > controles	

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: LPC: líquen plano cutâneo, LPO: líquen plano oral, CS: controles saudáveis, PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, IHQ: imuno-histoquímica, WB: *western-blot*, RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*, CF: citometria de fluxo, cDNA: *complementary DNA*, qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*, mDCs: células dendríticas mielóides, Tregs: células T reguladoras, TNF: *Tumor necrosis factor*, mRNA: *messenger RNA*.

3.4.3 TLRs nos folículos pilosos

Embora seja conhecido que os FP também expressem TLRs, o que reafirma a função de vigilância e barreira, os TLRs foram pouco estudados no FP. Em murinos sem doença foi demonstrada expressão de TLR2, TLR4 e TLR5¹³², e em humanos foi demonstrada a presença de TLR4 e TLR5 nos FP normais¹³³.

Em relação ao papel dos TLRs em pacientes com alopecias, um estudo demonstrou através da técnica de *microarray* e através de qPCR, aumento de TLR4 e TLR6 em amostras de tecido de pacientes com alopecias primárias, tanto neutrofílicas quanto linfocíticas, incluindo alguns pacientes de LPP⁷⁵.

3.5 HLA-G

3.5.1 Introdução

A sigla HLA-G deriva de *Human leukocyte antigen-G*, uma molécula do complexo de histocompatibilidade humano não clássica descrita pela primeira vez na interface materno-fetal¹³⁴. Durante a gravidez, as células trofoblásticas apresentam altos níveis de expressão de HLA-G, com função inibitória sobre o sistema imune e contribuem para o estabelecimento da tolerância materno-fetal. Diferente das moléculas de HLA clássicas, o HLA-G possui polimorfismo limitado e um número limitado de peptídeos ligantes. O HLA-G se apresenta em sete isoformas: HLA-G1 a HLA-G4 ligadas à membrana e três formas solúveis (HLA-G5 a HLA-G7). Ainda, existe uma forma solúvel denominada *shed* HLA-G, pode ser gerada por proteólise de formas ligadas à membrana¹³⁵.

O HLA-G possui papel imunossupressor: inibe a proliferação alogênica de células T CD4+ e NK (*natural killer*), a citotoxicidade de células T CD8+, a maturação

de células dendríticas e a ativação de células B¹³⁶. O HLA-G e seu papel imunossupressor são extensamente estudados como parte dos mecanismos de tolerância e rejeição de alotransplantes e como via de evasão imune de células cancerosas, associados à progressão da doença e ao prognóstico de pacientes com câncer^{136,137}. Interessantemente, também foi associado a vias alérgicas, doenças infecciosas, autoimunes e inflamatórias. Nesses casos, supõe-se que o aumento do HLA-G seja secundário, resultado de uma ativação imune descontrolada das células efectoras¹³⁶.

Em indivíduos saudáveis, embora o gene HLA-G seja expresso em baixos níveis de mRNA na maioria das células e tecidos humanos, incluindo a pele e queratinócitos¹³⁸, a transcrição proteica é restrita às células trofoblásticas, timo, córnea, pâncreas, matriz ungueal e precursores endoteliais¹³⁹.

3.5.2 HLA-G e a pele

Na pele normal, a expressão de HLA-G só pôde ser detectada em nível de transcrição¹⁴⁰. A maior parte dos artigos publicados caracterizam o HLA-G como ausente na pele normal ou nas células residentes (quadro 4).

Quadro 4 - Artigos em diversas dermatoses com expressão negativa de HLA-G na pele humana normal

Aractingi et al., 2001 ¹⁴⁵ Psoríase	87G e O1G (específicos para HLA-G1 e G5); 16G1 (específico para isoforma G5 solúvel) – cedido por Dan Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA 4H84 (isoformas desnaturadas) – cedido por Dr. M. Mc Master, San Francisco, CA
Khosrotehrani et al., 2001 ¹⁴² Dermatite atópica	87G – cedido por Dan Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA
Ibrahim et al., 2004 ¹⁴³ Lesões melanocíticas	4H84, IgG1 – cedido por M. McMaster, University of California, San Francisco, CA
Ito et al., 2005 ¹⁴⁴ Matriz ungueal	clone MEM-G/1 da marca Serotec (número do catálogo MCA2043)
Yari et al., 2008 ¹⁴⁵ Pênfigo vulgar	5E6H7 16 (específico para todas isoformas) – preparação do próprio laboratório 4H84 (específico para todas isoformas – cedido por S. Fisher and M. McMaster, University of California, San Francisco)
Wastowski et al., 2009 ¹⁴⁶ Pele de esclerose sistêmica	4H84 – cedido por Dr. E. Carosella, Hôpital Saint-Louis, Paris, France
Cardili, 2010 ¹⁴⁷ Psoríase	4H84 – cedido por McMaster University, San Francisco, CA

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

A expressão de HLA-G é induzida por IL10 e IFN- γ ¹⁴² e foi descrita em algumas doenças inflamatórias dermatológicas como psoríase^{141,147}, dermatite atópica¹⁴², pênfigo vulgar^{145,148}; e em lesões de pele de pacientes com esclerose sistêmica¹⁴⁶ e lúpus eritematoso sistêmico¹⁴⁹. Polimorfismos do gene de HLA-G foram associados a vitiligo¹⁵⁰. Supõe-se que a função do HLA-G em doenças inflamatórias e autoimunes seja parte de um equilíbrio dinâmico, influenciando tanto as respostas que levam à imunossupressão quanto à estimulação imunológica excessiva¹³⁹.

Até o momento, a expressão e função do HLA-G no folículo piloso e nas alopecias cicatriciais foram pouco estudadas. Não se sabe se estes reguladores imunológicos estão funcionalmente envolvidos no IP do FP¹⁵. O trabalho que consagrou a matriz ungueal como um local de privilégio imunológico, comprovou que a proteína HLA-G é fortemente expressa na matriz ungueal; cita ainda que não foi encontrada expressão de HLA-G na matriz do cabelo humano e em amostras de pele normal de couro cabeludo humano (Ito et al., observações não publicadas)¹⁴⁴.

Considera-se que haja expressão de HLA-G na porção cíclica de FP normais de murinos¹⁵¹. Um estudo em humanos se propôs a detectar a expressão da isoforma HLA-G1 por qPCR em biópsias de pele humana e concluiu que HLA-G1 estava ausente no material derivado de uma alopecia cicatricial. O mesmo estudo demonstrou que a transcrição de HLA-G poderia ser induzida em culturas de queratinócitos, mas com níveis muito variáveis de acordo com diferenças nas condições de cultivo¹⁴⁰.

Em humanos, um estudo avaliou por qPCR os níveis de expressão de mRNA de 42 genes relacionados a IP de FP. O mRNA de HLA-G foi significativamente regulado positivamente, tanto no terço inferior do FP, incluindo a região do bulbo, quanto na porção das bainhas em relação à epiderme não folicular¹⁵².

Deonizio, em sua tese de doutorado neste departamento¹⁵³, investigou a possível participação do HLA-G na micose fungóide foliculotrópica e demonstrou que expressão de HLA-G está diminuída em comparação à pele normal, couro cabeludo normal e couro cabeludo de pacientes com alopecia areata¹⁵⁴. Não há, contudo, descrição das regiões analisadas do FP.

3.6 CAVÉOLAS E CAVEOLINAS

3.6.1 Introdução

As cavéolas são um subtipo de balsa lipídica da membrana celular; consistem em invaginações em forma de ômega, compostas por colesterol, esfingomiéline e por proteínas chamadas caveolinas. São componentes estruturais dinâmicos e ao mudarem a conformação da membrana plasmática permitem a compartimentalização e a modulação de várias moléculas sinalizadoras. Assim, fazem parte da complexa orquestra envolvida nos processos celulares de tráfego lipídico, sinalização, migração e proliferação celular^{155,156}. As cavéolas estão presentes na membrana plasmática de todas as células de mamíferos e também em outras estruturas como retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias, endossomos, gotículas lipídicas, núcleo e vesículas extracelulares mas sua composição e níveis de expressão variam enormemente^{155,156}.

Os principais elementos estruturais das cavéolas são as caveolinas, proteínas de baixo peso molecular (18–24kDa) que se apresentam em três isoformas (1, 2 e 3) que interagem entre si para formar homo e hetero-oligômeros, que se ligam diretamente ao colesterol nas membranas. Ademais, interagem com lipídios específicos e com outras proteínas que podem conjuntamente formar as cavéolas. Assim, as caveolinas funcionam como proteínas de esqueleto (*scaffolding protein*) dentro das membranas das cavéolas¹⁵⁷.

Demonstrou-se que as cavéolas são essenciais para o desenvolvimento e funcionamento normais da pele e seus anexos; alterações foram relacionadas a várias doenças dermatológicas, incluindo câncer de pele, psoríase, alopecia, e situações como senescência celular, infecção e inflamação^{155,156}.

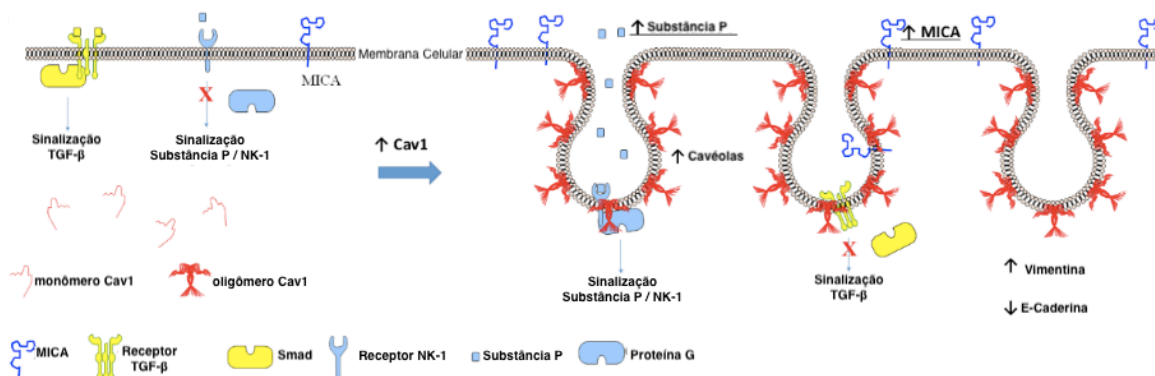
3.6.2 Cavéolas e caveolina-1 nos folículos pilosos

Em camundongos, os FP expressam Cav-1 de forma consistente, notadamente na região do *bulge*, por todas as fases do ciclo capilar. As células-tronco foliculares coexpressam Cav-1 e citoqueratina 15, um marcador característico destas células pluripotentes. De modo interessante, as células derivadas das células-tronco param de expressar Cav-1 quando deixam a região do *bulge*¹⁵⁸.

O papel regulador de Cav-1 foi descrito em inúmeras vias de sinalização. Cav-1 regula positivamente a expressão de IFN- γ , o principal indutor do colapso do IP e gera um ambiente favorável ao colapso do IP do *bulge*, inibindo os guardiões do IP (sinalização TGF- β), estimulando supressores do IP (Substância P e MICA - *MHC class I chain-related gene A*) e promovendo TEM (regulando positivamente a vimentina e regulando negativamente a E-caderina)¹⁵⁹.

Os FP de couro cabeludo humano também expressam Cav-1. Estudos preliminares indicam que sua expressão é significativamente elevada em FP de pacientes com AFF, o que fez com que os autores elaborassem uma hipótese para o papel da Caveolina-1 no desenvolvimento desta enfermidade (figura 7)¹⁶⁰. A relação entre Cav-1 e LPP ainda não foi investigada.

Figura 7 - Hipótese proposta para o papel de Caveolina-1 no desenvolvimento da alopecia frontal fibrosante



Fonte: Adaptado de Jozic et al., 2021¹⁶⁰

Legenda: O aumento da expressão de caveolina-1 (Cav-1) permite que Cav-1 monomérico oligomerize na membrana celular e induza a formação de cavéolas. A regulação positiva de Cav-1 leva ao aumento dos níveis de Substância P e promove a localização de seu receptor NK-1 nas cavéolas, onde NK-1 interage com a proteína G a jusante, resultando em sinalização sustentada da Substância P. Cav-1 antagoniza a sinalização de TGF- β (*Transforming growth factor- β*) ao sequestrar seus receptores e impedir a fosforilação e sinalização através de Smad2 (*Mothers against decapentaplegic homolog 2*). A regulação positiva de Cav-1 foi associada à regulação positiva de MICA (*MHC class I chain-related gene A*) e Vimentina e regulação negativa de E-caderina.

O papel de Cav-1 como *scaffolding protein* e moduladora das vias de diversos TLRs foram descritos em diferentes tipos celulares e tecidos murinos e humanos, mas nunca na pele humana e no FP¹⁶¹⁻¹⁶⁵.

4 MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

O presente estudo foi comparativo observacional, prospectivo e transversal. Onze participantes com LPP de ambos os sexos e com idade acima de 18 anos foram selecionados no ambulatório de tricologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em sua primeira consulta do ambulatório de tricologia. Um participante foi excluído por relatar uso de prednisona oral - medicação imunossupressora e moduladora.

O grupo controle foi composto por onze pacientes de ambos os sexos e com idade acima de 18 anos, submetidos a neurocirurgia com incisão cirúrgica no couro cabeludo, e que não apresentavam história de doença dermatológica nem alterações ao exame dermatológico no dia da cirurgia. Os controles foram pareados por sexo e por idade (± 5 anos).

Os pacientes de LPP e os controles foram informados do conteúdo da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – da Diretoria Clínica do HCFMUSP (parecer de número 2.509.708) (Anexo B).

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos através da entrevista pessoal dos pacientes na primeira consulta e nas consultas de seguimento no ambulatório de tricologia do HCFMUSP.

4.2.1 Lichen planopilaris activity index (LPPAI)

O LPPAI é um escore numérico introduzido por Chiang et al. (2010)¹⁶⁶ que quantifica os sinais e sintomas do LPP possibilitando padronização e comparação estatística. A figura 8 corresponde ao quadro publicado no artigo traduzido para o português. O quadro tem colunas em branco para que seja preenchido em todas as consultas do paciente para padronizar o acompanhamento.

O LPPAI acessa sintomas (prurido, dor, queimação), sinais (eritema, eritema perifolicular e descamação perifolicular) que são pontuados de 0 a 3 (0= negativo, 1= +/-, 2= +, 3= ++, +++). Também registra a presença (1) ou ausência (0) de crostas, pústulas, resultado do teste de tração anágena e progressão da doença.

O teste de tração anágena consiste em segurar de 10 a 20 cabelos entre o polegar, o segundo e o terceiro dedos junto ao couro cabeludo e afastar-se firmemente do couro cabeludo com uma força perpendicular para deslizar os dedos até as pontas dos cabelos. O teste é considerado positivo se há destacamento de pelo menos um fio anágeno.

Por último, a avaliação da progressão da doença, registrada como 0 (ausente) versus 1 (indeterminado) versus 2 (presente).

Estas medidas subjetivas e objetivas pontuam um valor numérico para estabelecer um escore de atividade da doença que vai de 0 a 10. Os pesos dados aos sintomas (30%), sinais (30%), teste de tração anágena (25%) e presença de

progressão da doença (15%) levam à equação: LPPAI (0-10) = (prurido + dor + ardor + eritema do couro cabeludo + eritema perifolicular + descamação perifolicular) / 3 + 2,5 (teste de tração) + 1,5 (progressão / 2).

Figura 8 - *Lichen planopilaris activity index* (LPPAI)

Data da visita			
LPPAI (veja abaixo)			
ESCALA 0-3			
A Prurido			
B Dor			
C Queimação			
D Eritema			
E Eritema perifolicular			
F Descamação perifolicular			
Crostas			
Pústulas			
Teste de tração: Anágeno/total (0=-, 1=+)			
Progressão? Não (0) ? (1) sim (2)			

Fonte: Adaptado de Chiang et al., 2010¹⁶⁶.

Legenda: LPPAI (0-10) = (A+B+C+D+E+F)/3 + 2,5(teste de tração) + 1,5(progressão/2)

Escala: 0=negativo 1=+/- 2=+ 3=++, +++

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os pacientes de LPP selecionados foram submetidos à anestesia local com lidocaína e exérese com *punch* 6mm de 2 áreas do couro cabeludo: uma área considerada clinicamente inflamada do couro cabeludo, marcada por tricoscopia, e outra área do couro cabeludo com ausência de sinais clínicos ou tricoscópicos de inflamação. As fotos tricoscópicas foram obtidas através do DermLite II pro (3Gen, San Juan Capistrano, CA, EUA) conectado a um iPhone (Apple, Cupertino, CA, EUA).

Dos controles, as amostras de couro cabeludo (*punch* 6mm) foram coletadas em uma área de trajeto da incisão cirúrgica da neurocirurgia que não apresentava sinais clínicos ou tricoscópicos de inflamação.

As 31 amostras – 20 dos casos e 11 dos controles – foram fixadas em solução tamponada de formalina 10% por 24 horas, seccionadas verticalmente e embebidas em parafina de modo que cada amostra fosse representada por 2 metades. A avaliação histopatológica dos fragmentos de pele foi realizada através da coloração de hematoxilina-eosina (HE).

A avaliação das lâminas de HE foi realizada de forma cega e independente pela autora da pesquisa e por uma dermatopatologista do laboratório de dermatopatologia do HCFMUSP. Os resultados discordantes tiveram as lâminas revisadas conjuntamente pelas duas avaliadoras, atingindo 100% de concordância. A análise da intensidade do infiltrado inflamatório foi realizada através de estimativa por campo de maior aumento (400x). A intensidade foi graduada como infiltrado inflamatório leve (1+): aquele que ocupava menos que metade do campo de 400x. Moderado (2+): de metade a um campo de 400x. Intenso (3+): mais de um campo de 400x. Além disso, quando o infiltrado era liquenoide ou havia agressão linfocitária folicular, a intensidade era considerada no mínimo como moderada.

Para análise comparativa com sinais clínicos e de dermatoscopia, foi considerada a lâmina com maior intensidade do infiltrado inflamatório.

4.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

A técnica de IHQ foi utilizada para a demonstração da expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 e HLA-G nos espécimes de pacientes com LPP e no grupo controle.

Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 *amino-propyltriethoxy-silane* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. Cada amostra foi representada por duas metades do fragmento em corte longitudinal.

Os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, em temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavagem em água corrente por 5 minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com 3 incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em panela à vapor (*steamer*) ou banho maria a 95°C. As lâminas foram colocadas na solução Target Retrieval Solution pH 9,0 (cód. S2367, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) ou na solução Target Retrieval Solution pH 6,0 (cód. S1699, DakoCytomation) dependendo do anticorpo utilizado (tabela 2).

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS (*Phosphate buffered saline*) pH 7.4.

A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (tabela 2) diluídos em BSA (*Bovine Serum Albumin*) fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7.4, “*over-night*” a 4°C.

Tabela 2 - Relação e especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica cutânea

Anticorpo	Código	Marca	Diluição	Recuperação antigênica	Sistema de Detecção	Controle positivos
TLR2	SC-10739	Santa Cruz	1:25	Steamer 95°C 30' (S1699)	Novolink	Pele normal
TLR3	ab62566	Abcam	1:1000	Banho Maria 95°C 20' (S2367)	Reveal	Pele com molusco contagioso
TLR4	ab22048	Abcam	1:100	Banho Maria 95°C 20' (S1699)	Reveal	Pele normal
TLR5	ab115603	Abcam	1:40	Banho Maria 95°C 20' (S1699)	Novolink	Pele de lúpus eritematoso
HLA-G	SC-21799	Santa Cruz	1:50	Banho Maria 95°C 30' (S2367)	Novolink	Placenta

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: TLR-2: *toll-like receptor 2*; TLR-3: *toll-like receptor 3*; TLR-4: *toll-like receptor 4*; TLR-5: *toll-like receptor 5*; HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano G.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário. As lâminas que receberam o Novolink Max Polymer Detection System (cód. K0690, Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine, UK) foram incubadas em câmara úmida durante 30 minutos em temperatura ambiente. De maneira semelhante, as lâminas que receberam o sistema Reveal Biotin-Free (cód. SPD-125, Spring Bioscience, Pleasanton, CA) foram incubadas com o complemento, por 30 minutos a 37°C.

Para a etapa de revelação dos sítios antigênicos dos marcadores foi utilizada a solução cromógena TrueBlue Peroxidase substrate (cód. 71-00-64, KLP, Gaithersburg, USA), pronta para uso. A escolha de cromógeno alternativo a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que é rotineiramente utilizada teve o intuito de não interferência na quantificação de intensidade de marcação, antecipando que a cor do Dab seria indistinguível da melanina naturalmente presente nos FP.

As lâminas foram lavadas em água destilada por 2 minutos e contracoradas com vermelho rápido, por 2 minutos. A seguir foram lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

4.5 ANÁLISE DE IMAGEM E QUANTIFICAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

As lâminas foram escaneadas utilizando-se o escâner de lâminas Pannoramic Scan – 3DHistech (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary). As lâminas digitalizadas foram exportadas em formato .TIFF e convertidas para .JPG com máxima qualidade, e posteriormente submetidas a análise quantitativa da expressão dos marcadores.

Para as análises de imagem foi utilizado o programa Image-Pro Plus, versão 4.5.0.29 para Windows (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA). As áreas de interesse foram delimitadas manualmente e a presença e intensidade da marcação foram identificadas pelo software através de um espectro de cor pré-definido por um patologista com experiência neste tipo de análise e aplicado a todas as imagens. Foram realizadas medidas em segmentos da epiderme e em todas as partes dos FP presentes no corte histológico: infundíbulo, istmo, região suprabulbar e bulbo. Na maioria dos cortes estavam presentes mais de 1 FP e todos foram avaliados.

Em cada área de interesse foi obtida a área positiva (AP), área total (AT) e a *Integrated Optic Density* (IOD) - produto da densidade de cor (DMC) pela área positiva (em μm^2). Dividimos o IOD pela área positiva para obter a DMC, que varia numa escala de 0 a 255 (na qual 0 corresponde ao preto e 255 ao branco). Posteriormente calculou-se um valor que representa a expressão da coloração (EColor) que inclui valores de área e cor, através da seguinte fórmula: $\{ [255 - (IOD/AP)] \times AP \} / AT$.

4.6 ESTUDO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A técnica de IFD foi realizada no Laboratório do Prof. Ivan Jozic (Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, Florida, EUA) durante estágio no exterior viabilizado pelo Programa Institucional De Internacionalização (PRINT) - Edital:CAPES/PRINT - Edital nº 41/2017, N° do Processo: 88887.694579/2022-00.

A expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 foi avaliada em dupla marcação com Cav-1 nos espécimes de pacientes com LPP e no grupo controle.

Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas de carga eletrostática positiva (VWR, Radnor, PA, Superfrost White, cód. 75799-266). Cada lâmina continha 3 pares de fragmento, sendo 1 par formado pelas metades do corte longitudinal; dois pares eram submetidos ao protocolo e um par servia como controle negativo.

Os cortes histológicos foram desparafinizados em três banhos de xilol de 3 minutos, à temperatura ambiente. Na sequência, os espécimes foram submetidos a três banhos de etanol 100% de 2 minutos, dois banhos de etanol 90% de 2 minutos e hidratados em bateria decrescente de etanol (70%, 50% e 30%) por 2 minutos cada. Posteriormente colocados em dois banhos de 5 minutos em água destilada.

Para exposição dos sítios antigênicos foram colocadas em banho maria a 95°C por 30 minutos em solução tampão de citrato de sódio (10mM Citrato de sódio, 0,05% Tween 20®, pH 6.0) e depois resfriadas em banho gelado por 20 minutos.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (tabela 3) diluídos em soro normal de cabra 1% em TBS-t 0,05% (*Tris-Buffered Saline* com detergente Tween 20®), “*over-night*” a 4°C.

Tabela 3 - Relação e especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunofluorescência direta cutânea

Anticorpo	Código	Marca	Animal hospedeiro	Diluição
TLR2	ab9100	Abcam	camundongo	1:50
TLR3	sc-32231	Santa Cruz	camundongo	1:150
TLR4	ab22048	Abcam	camundongo	1:200
TLR5	sc57461	Santa Cruz	camundongo	1:100
Cav-1	HPA 049461	Sigma	coelho	1:100

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: TLR2: *toll-like receptor 2*; TLR3: *toll-like receptor 3*; TLR4: *toll-like receptor 4*; TLR5: *toll-like receptor 5*; Cav-1: Caveolina-1.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por 3 vezes em TBS-t, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em soro normal de cabra 1% em TBS-t 0,05% durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Em sequência as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários AlexaFluor 488 anti-coelho e AlexaFluor 594 anti-camundongo (Invitrogen by Thermo fisher Scientific, Life Technologies, Eugene, OR/USA, cód. A11008 e A11005) diluídos em 1:300 em soro normal de cabra 1% em TBS-t 0,05% por 1 hora, à temperatura ambiente protegidas da luz.

As lâminas foram lavadas em TBS-t 0,05% por 2 vezes, por 5 minutos cada e posteriormente em TBS (*Tris-Buffered Saline*) por 5 minutos. As lâminas foram montadas com Prolong gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen by Thermo fisher Scientific, Life Technologies, Eugene, OR/USA, ref. P36931) e armazenadas a -80°C.

4.7 ANÁLISE DE IMAGEM E QUANTIFICAÇÃO DAS MARCAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

As lâminas foram fotografadas em magnificação de 200x com o microscópio Keyence-Biozero 9100 (Keyence Corporationm Osaka, Japão). As imagens foram armazenadas em formato TIFF. Para avaliação da expressão de TLRs isolou-se o canal vermelho e para avaliação de Cav-1 isolou-se canal verde. As células positivamente marcadas foram manualmente identificadas em diferentes áreas do FP (infundíbulo, istmo, suprabulbar e bulbo) e a intensidade da marcação e a área foram medidas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, NIH) em unidades arbitrárias de intensidade por pixel.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos foram testados em relação à sua distribuição, teste de Shapiro-Wilk, e foram descritos pela média e seu respectivo desvio padrão.

A comparação da intensidade de marcação por IHQ e IFD de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR5, HLA-G e Cav-1 nos grupos avaliados foi realizada através do teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Para a correlação do tempo de doença com o LPPAI calculou-se o coeficiente de correlação r (rho) de Spearman. Para a correlação da expressão dos marcadores com o LPPAI e com a intensidade do infiltrado inflamatório foi escolhido o valor medido no istmo e também o coeficiente de correlação r (rho) de Spearman. O r de Spearman foi interpretado como: 0,9 para mais ou para menos indicativo de correlação muito forte, 0,7 a 0,9 positivo ou negativo indicativo de correlação forte, 0,5 a 0,7 positivo ou negativo indicativo de correlação moderada, 0,3 a 0,5 positivo ou negativo indicativo de correlação fraca e 0 a 0,3 positivo ou negativo indicativo de correlação desprezível.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa “GraphPadPrism” versão 10.0 para Mac (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES COM LPP

Dos 10 pacientes com LPP incluídos no estudo, 8 eram do gênero feminino e 2 do gênero masculino, com idades variando entre 35 e 69 anos (média de 53 anos). Em relação à cor, 4 pacientes eram brancos e 5 pardos e 1 negro. A média do tempo de doença variou de 0,5 a 26 anos (média de 5,05 anos, mediana de 2,75 anos) e o LLPAI variou de 0,66 a 4,33 (média de 2,33) (tabela 4). Não houve correlação entre o tempo de doença e o LLPAI ($r = 0,5240$; $p = 0,1239$).

A figura 9 contém fotografias clínicas dos pacientes com diagnóstico de LPP incluídos no estudo e as respectivas imagens de tricoscopia das áreas biopsiadas como área afetada e como área não afetada em aumento de 20x.

Em relação a comorbidades:

- a) o caso 1 referia transtorno de ansiedade generalizado em tratamento com duloxetina;
- b) o caso 2 referia diabetes mellitus em tratamento com metformina;
- c) o caso 3 referia hipotireoidismo, rinite, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e dispepsia em tratamento com levotiroxina, glifage, glibenclamida, losartana, atenolol, anlodipina, buscopan, omeprazol, bromoprida, budesonida spray;
- d) o caso 4 referia hipertensão arterial sistêmica em tratamento com enalapril;
- e) o caso 5 negava comorbidades;
- f) o caso 6 referia esquizofrenia em tratamento com diazepam, biperideno, haloperidol;
- g) o caso 7 negava comorbidades;

- h) o caso 8 referia hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia em tratamento com losartanta, hidroclorotiazida, anlodipino, sinvastatina, e uso de etinilestradiol e acetato de noretisterona como terapia de reposição hormonal;
- i) o caso 9 referia hiperparatireoidismo, diabetes mellitus, dislipidemia, hipotireoidismo em tratamento com calcitriol, cálcio, metformina, sinvastatina e levotiroxina;
- j) o caso 10 referia osteopenia em tratamento com cálcio, vitamina D, cloreto de magnésio.

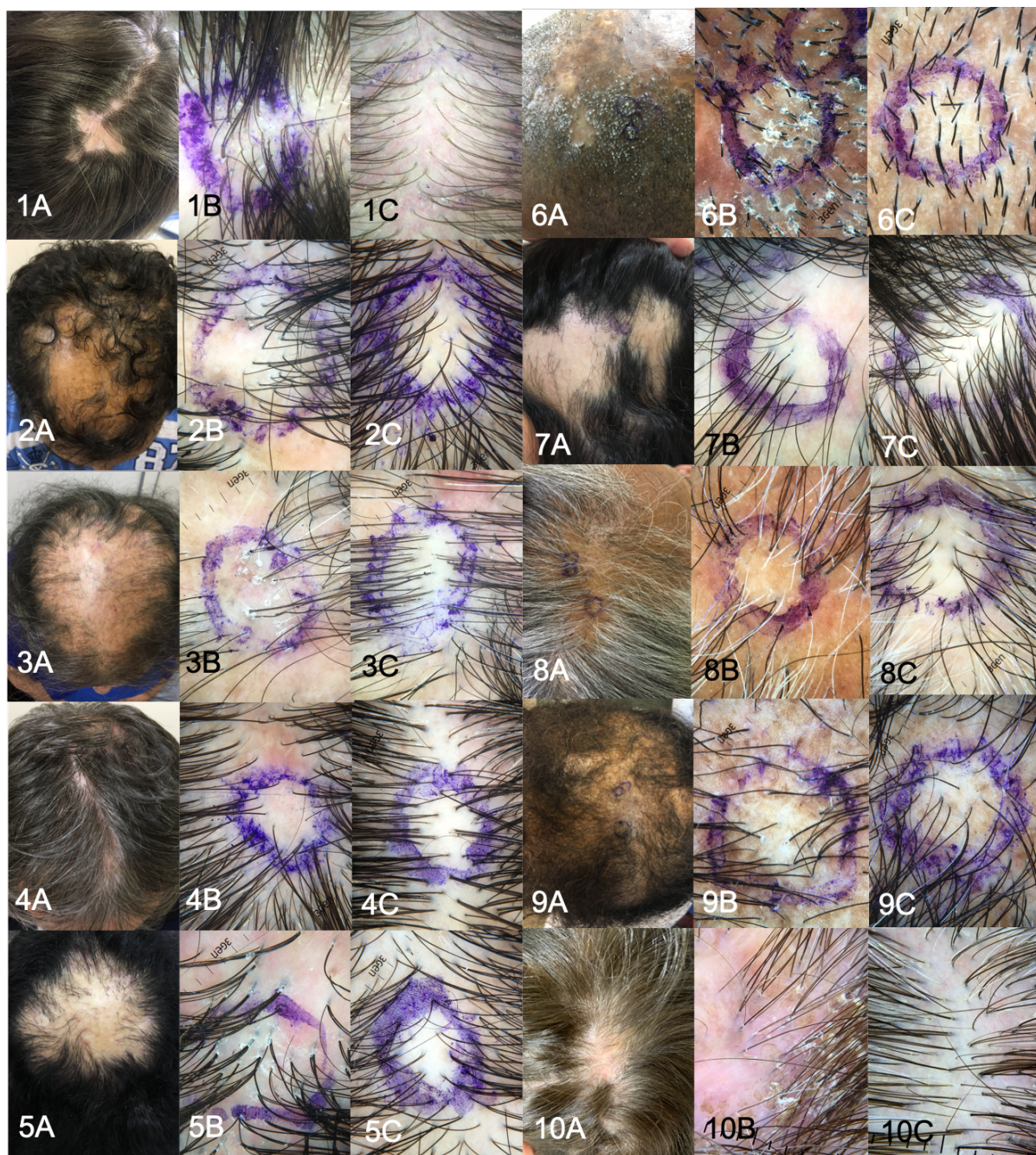
Tabela 4 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes com líquen plano pilar

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	M	F	M	F	F	F	F	F	F
Idade	45	40	64	62	35	50	41	62	62	69
Cor	branca	parda	parda	branca	branca	negra	parda	parda	parda	branca
História de doença (anos)	5	0,5	2	1	5	26	5	1,5	3,5	1
Prurido	3	0	0	1	3	3	0	3	2	2
Dor	2	0	0	0	0	3	0	3	1	0
Queimação	3	0	0	0	3	3	0	3	2	0
Eritema	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
LPPAI Eritema PF	1	1	1	0	2	0	1	1	0	1
Descamação PF	1	1	2	0	2	3	1	1	1	1
Crostras	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Pústulas	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pull test</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LPPAI (0-10)	3,33	0,66	1,66	0,66	3,66	4,33	0,66	3,66	2,33	2,33

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: LPPAI: *Lichen planopilaris activity index*; PF: perifolicular.

Figura 9 - Quadro clínico e tricoscopia dos locais de biópsia dos pacientes com líquen plano pilar



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: Caso 1 a 10. A: apresentação clínica dos pacientes com diagnóstico de líquen plano pilar; B: tricoscopia da área biopsiada como área afetada (20x); C: tricoscopia da área biopsiada como área não afetada (20x).

5.2 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS CONTROLES

Onze controles de couro cabeludo normal foram incluídos no estudo, 8 (73%) eram do gênero feminino e 3 (27%) masculino, com idades entre 34 e 68 anos (média 55,18 anos).

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O exame histopatológico foi realizado em todas as amostras: das áreas afetadas e não afetadas dos pacientes de LPP e dos controles saudáveis. A tabela 5 descreve os achados histopatológicos de cada amostra, representada por duas metades do fragmento em corte longitudinal.

Nas áreas afetadas, todos os pacientes apresentaram infiltrado inflamatório ao redor do istmo (peristmite) com intensidade variando como leve (1+) em 5, moderado (2+) em 3; e intenso (3+) em 2 pacientes. O infiltrado mostrou-se linfo-histiocitário em todos os pacientes, e foram encontrados plasmócitos e neutrófilos em 1 paciente e raros plasmócitos em outro doente. Alterações da epiderme estavam presentes em 7 amostras e incluíram paraqueratose, espongiose, retificação e acantose. Notou-se infiltrado inflamatório perissebáceo em 3 pacientes, fibrose interfolicular em 2 pacientes, infiltrado linfocítico liquenoide interfolicular em 1 paciente, extrusão de pelo com reação granulomatosa do tipo corpo estranho em 1 paciente e abscesso intrafolicular em 1 paciente.

Nas áreas não afetadas, 5 amostras apresentaram infiltrado inflamatório ao redor do istmo cuja intensidade variou em leve (1+) em 4, moderado (2+) em 1. O infiltrado era linfo-histiocitário em todos os pacientes, e em 1 amostra estavam presentes eosinófilos. Alterações da epiderme estavam presentes em 2 pacientes e incluíram espongiose e retificação. Havia infiltrado inflamatório perissebáceo em 3 pacientes.

Das 11 amostras dos controles, 7 não apresentaram infiltrado inflamatório, 4 apresentaram infiltrado linfo-histiocitário perifolicular leve (1+) na região do infundíbulo e 4 na região do istmo, também considerado leve (1+). Alterações da epiderme estavam presentes em 5 controles e incluíram acantose, espongirose e retificação. Rolhas córneas, exocitose de linfócitos, infiltrado liquenoide perifolicular e fibrose com mucina estavam ausentes. Dois controles apresentaram infiltrado linfo-histiocitário ao redor das glândulas sebáceas.

Tabela 5 - Achados histopatológicos dos pacientes com líquen plano pilar e controles

LPP área afetada										
Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peristmite	1+	2+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	1+	1+
Epiderme	NL	PARA, ESP	RET	ACAN, ESP	ACAN	ACAN	NL	ACAN	NL	ACAN, RET
Hiperqueratose periosteal	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0
Perinfundibulite	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Degeneração vacuolar do epitélio folicular	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0
Exocitose de linfócitos	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0
Infiltrado perifolicular liquenoide	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0
Infiltrado perifolicular rechaçado por fibrose	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+
Fibrose com mucina	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+
Fibrose eosinofílica	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0
LPP área não afetada										
Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peristmite	0	0	0	0	1+	2+	1+	1+	0	1+
Epiderme	NL	ESP	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	RET
Hiperqueratose periosteal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perinfundibulite	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0
Degeneração vacuolar do epitélio folicular	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0
Exocitose de linfócitos	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+
Infiltrado perifolicular liquenoide	0	+	0	0	0	+	+	0	0	0
Infiltrado perifolicular rechaçado por fibrose	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
Fibrose com mucina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrose eosinofílica	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0

Continua

Conclusão

Controles											
Controles	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Peristmite	0	1+	0	0	1+	0	0	0	1+	1+	0
Epiderme	RET	NL	NL	RET	ACAN, ESP	NL	RET	RET	NL	NL	NL
Hiperqueratose periosteal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
Perinfundibulite	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0
Degeneração vacuolar do epitélio folicular	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Infiltrado perifolicular rechaçado por fibrose	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+
Fibrose eosinofílica	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: Intensidade da peristmite (infiltrado inflamatório ao redor do istmo): ausente (0), leve (1+): ocupa menos que metade do campo de 400x, moderado (2+): de metade a um campo de 400x, intenso (3+): mais de um campo de 400x. (+) presente, NL: normal, PARA: paraqueratose, ESP: espongirose, RET: retificação, ACAN: acantose.

5.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

5.4.1 Análise da expressão de TLR2, TLR4 e TLR5

As reações de IHQ dos anticorpos anti-TLR2, TLR4 e TLR5 com os anticorpos e o protocolo descrito na sessão 4.4 não tiveram êxito. O cromógeno azul não mostrou marcação específica e em conjunto com a contracoloração vermelha resultou em coloração arroxeadada por toda lâmina.

5.4.2 Análise da expressão de TLR3

Cada amostra foi representada por 2 metades do fragmento de couro cabeludo em corte longitudinal. A marcação do anticorpo anti-TLR3 nos grupos controle, LPP área afetada e área não afetada é ilustrada nas figuras 10 e 11. As características da marcação são mostradas na figura 12 e descritas a seguir:

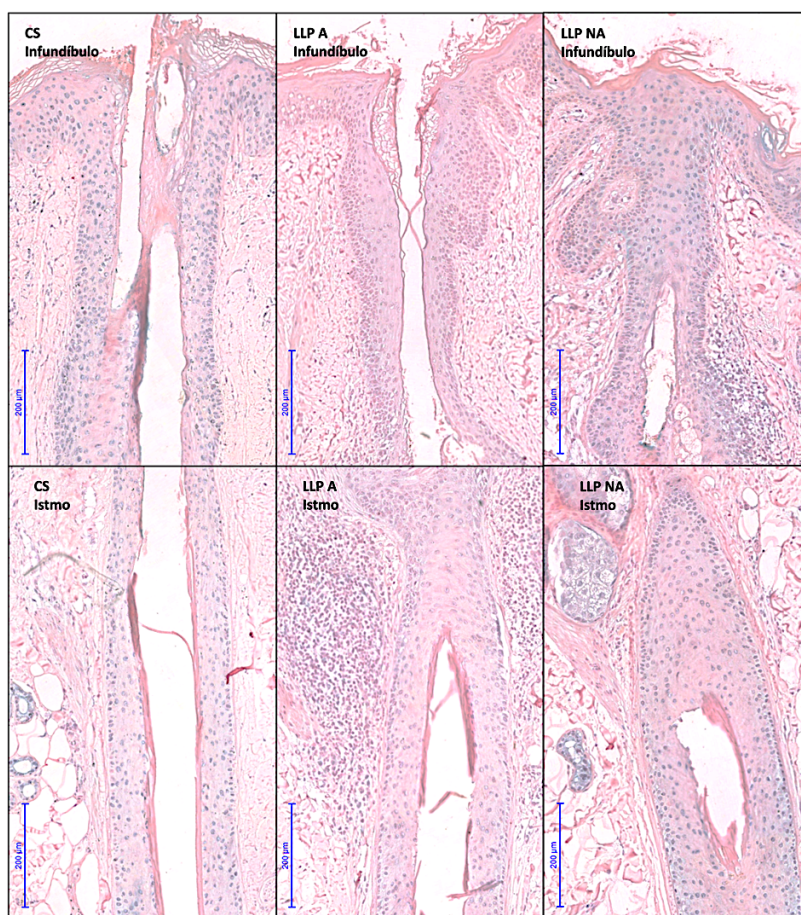
- Presente no infundíbulo, padrão perinuclear e citoplasmático;
- Presente na BRE na região do istmo, padrão perinuclear e citoplasmático;
- Presente na BRE na região suprabulbar, padrão perinuclear e citoplasmático;
- Ausente na BRI;
- Presente no bulbo, padrão perinuclear e citoplasmático.

Comparou-se a expressão do TLR3 em cada região nos 3 grupos, aferida como porcentagem de área marcada, em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ e EColor. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tanto na porcentagem de área

marcada ($p = 0,0222$) quanto na EColor ($p = 0,0091$) mas que não se confirmou no teste de Tukey (Gráfico 1).

A expressão de TLR3 no istmo da área afetada, medida por porcentagem de área marcada e EColor, não teve correlação estatisticamente significativa com o LPPAI ($p = 0,9932$ e $p = 0,9237$) nem com a intensidade do infiltrado inflamatório. ($p = 0,4897$ e $p = 0,6984$).

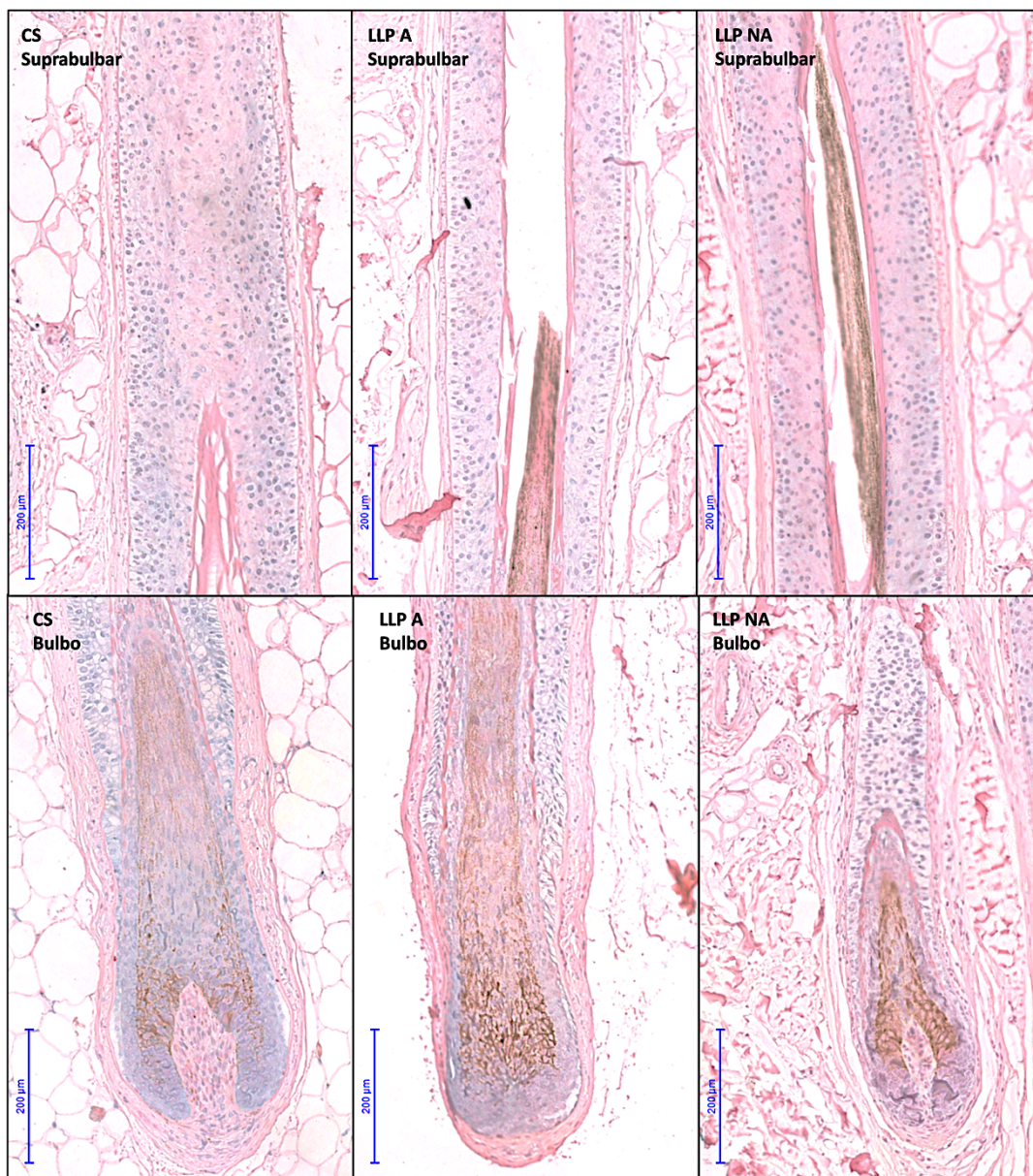
Figura 10 - Imuno-histoquímica com anti-TLR3 no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, área do infundíbulo e istmo



Fonte: Departamento de Dermatologia - HCFMUSP.

Legenda: CS: controle saudável, fotos referentes ao controle 11; LLP A: líquen plano pilar área afetada; LLP NA: líquen plano pilar área não afetada, fotos referentes ao paciente 1. Aumento 10x. Barra de escala: 200μm.

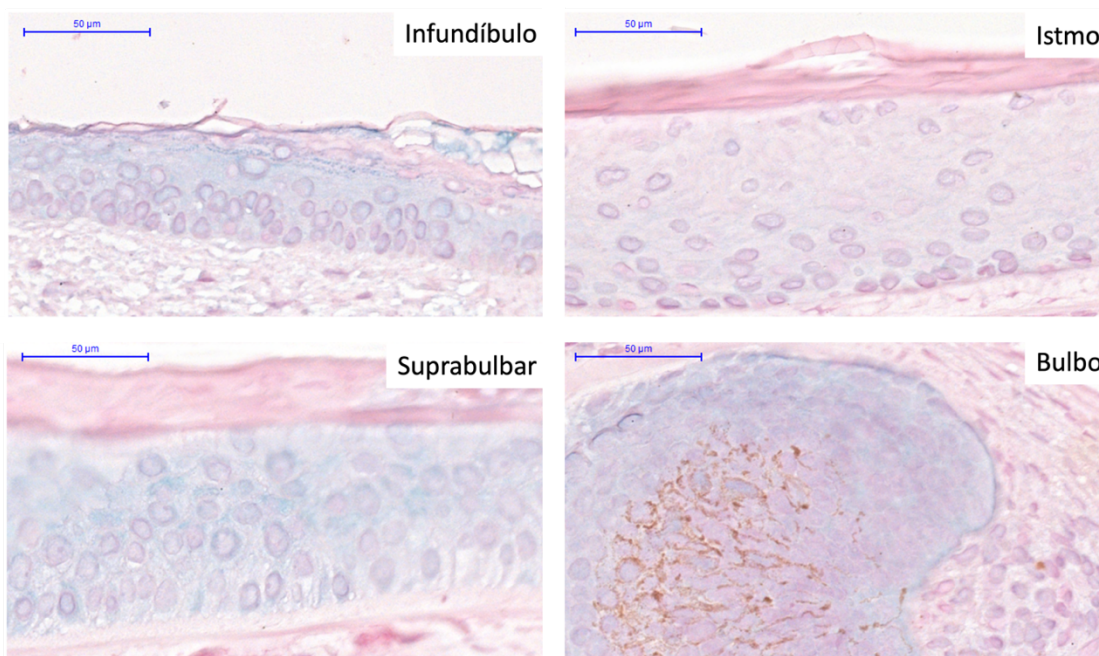
Figura 11 - Imuno-histoquímica com anti-TLR3 no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com Líquen plano pilar em área afetada e não afetada, regiões suprabulbar e bulbo



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: CS: controle saudável, fotos referentes ao controle 11; LLP A: líquen plano pilar área afetada; LLP NA: líquen plano pilar área não afetada, fotos referentes ao paciente 1. Aumento 10x. Barra de escala: 200µm.

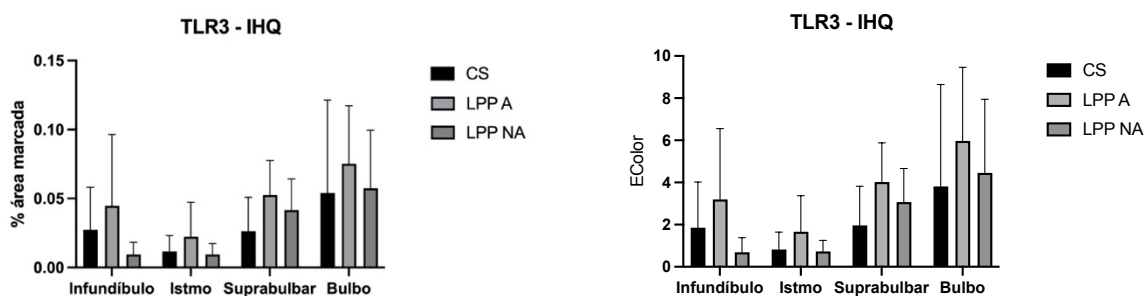
Figura 12 - Características da marcação com anti-TLR3 no folículo piloso por imuno-histoquímica em grande aumento



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: Aumento de 400x. Barra de escala: 50µm.

Gráfico 1 - Comparação da expressão de TLR3 por imuno-histoquímica entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar, EColor: expressão da coloração.

5.4.3 Análise da expressão de HLA-G

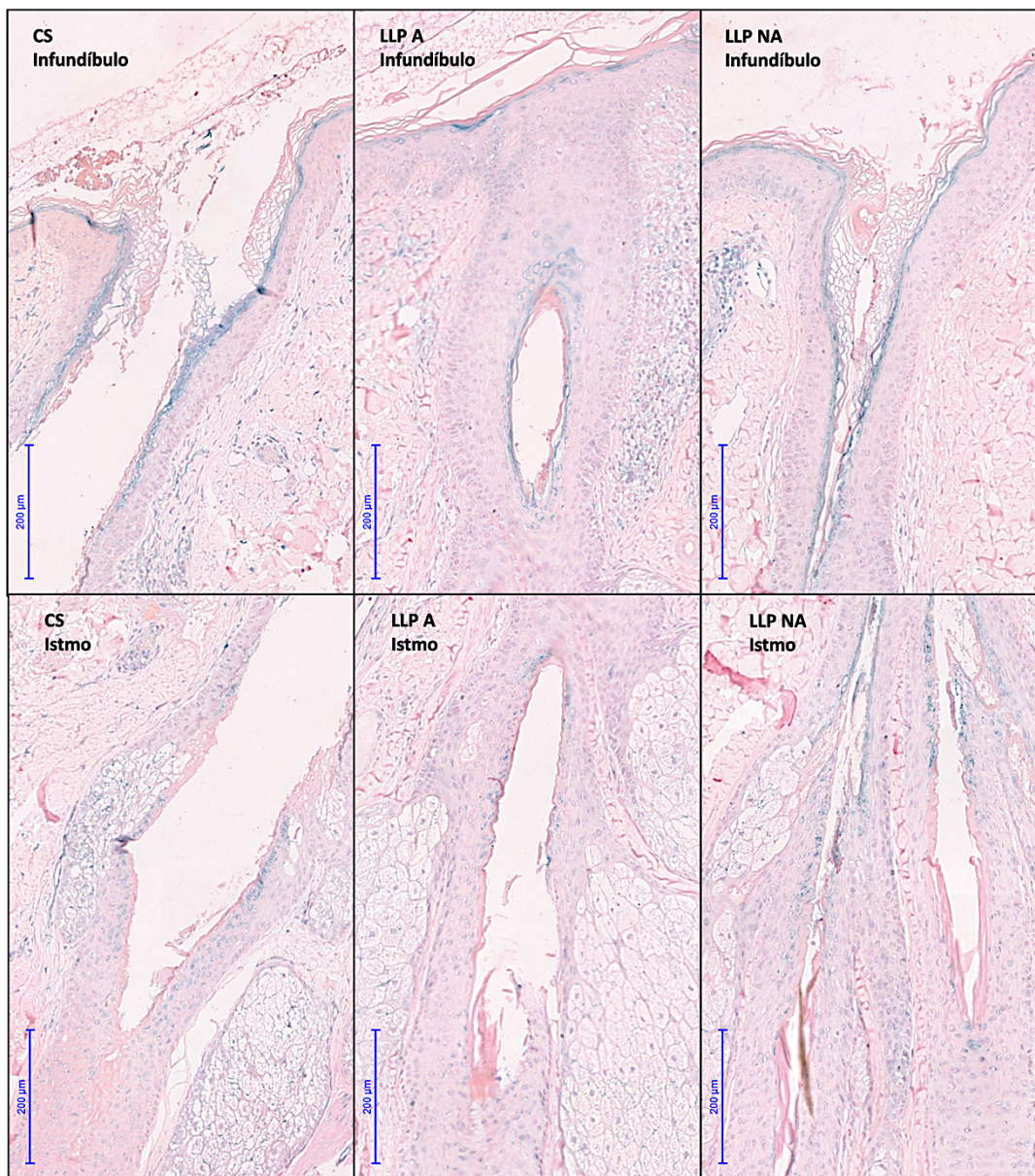
Cada amostra foi representada por 2 metades do fragmento de couro cabeludo em corte longitudinal. A marcação do anticorpo anti-HLA-G é ilustrada nas figuras 13 e 14. As características da marcação são mostradas na figura 15 e descritas a seguir:

- Presente na camada granulosa no infundíbulo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE no istmo, padrão perinuclear, mais evidente nas camadas celulares mais próximas à BRI;
- Presente na BRE na região suprabulbar, padrão perinuclear, discreta;
- Ausente na BRI;
- Presente na medula da haste capilar e bulbo, padrão perinuclear.

Comparou-se a expressão do HLA-G em cada região nos 3 grupos, aferida como porcentagem de área marcada, em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ e EColor. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos na porcentagem de área marcada ($p = 0,0039$) e EColor ($p = 0,0012$). No teste de comparação múltipla de Tukey a porcentagem de área marcada e EColor no bulbo foi maior na área afetada em relação a área não afetada ($p = 0,0008$ e $p = 0,0004$) e em relação aos controles saudáveis ($p = 0,0057$ e $p = 0,0016$). Não houve diferença estatística entre os controles e área não afetada ($p = 0,7713$ e $p = 0,8593$) (Gráfico 2).

A expressão de HLA-G no istmo da área afetada, medida por porcentagem de área marcada e EColor, não teve correlação estatisticamente significativa com o LPPAI ($p = 0,7771$ e $p = 0,8307$) nem com a intensidade do infiltrado inflamatório ($p = 0,4392$ e $p = 0,2116$).

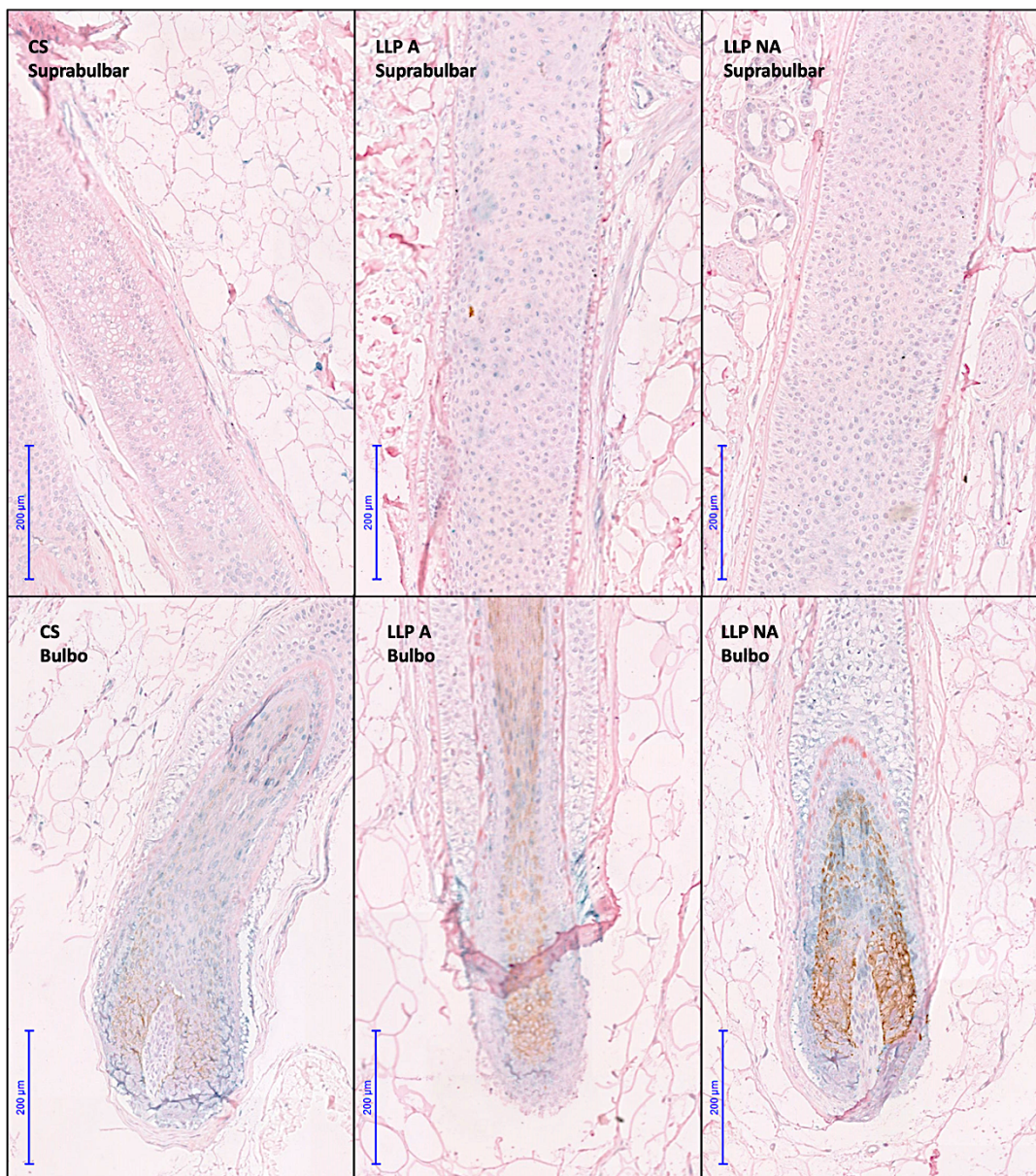
Figura 13 - Imuno-histoquímica com anti-HLA-G no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, área do infundíbulo e istmo



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: CS: controle saudável, fotos referentes ao controle 3; LLP A: líquen plano pilar área afetada; LLP NA: líquen plano pilar área não afetada, fotos referentes ao paciente 4. Aumento 10x. Barra de escala: 200µm.

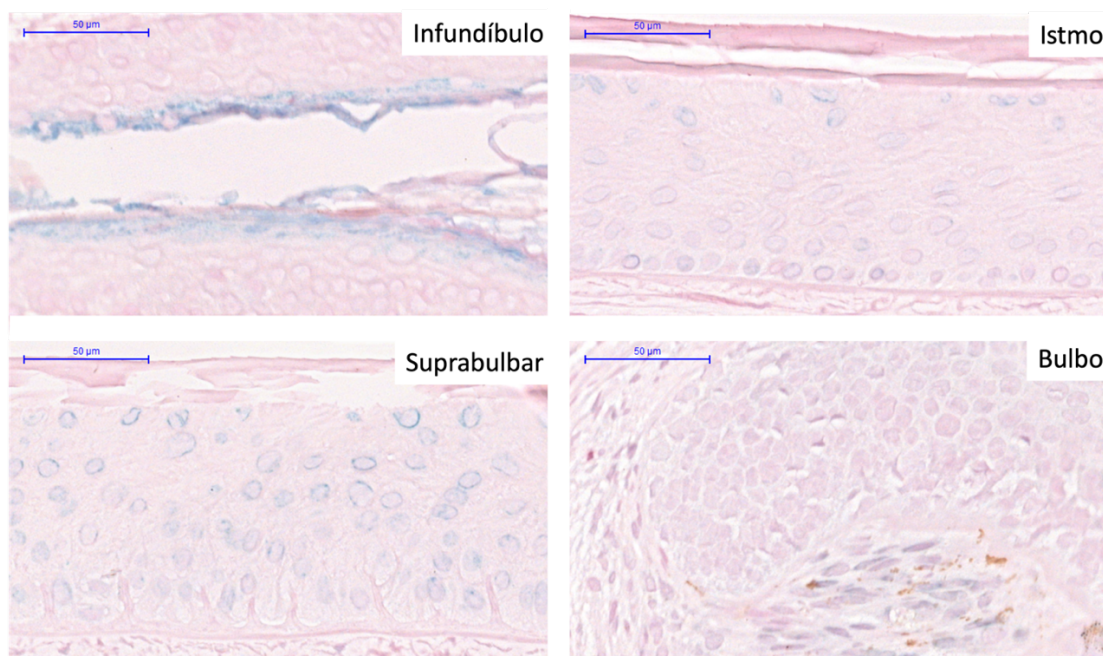
Figura 14 - Imuno-histoquímica com anti-HLA-G no couro cabeludo normal e no couro cabeludo dos pacientes com líquen plano pilar em área afetada e não afetada, regiões suprabulbar e bulbo



Fonte: Departamento de Dermatologia - HCFMUSP.

Legenda: CS: controle saudável, fotos referentes ao controle 3; LLP A: líquen plano pilar área afetada; LLP NA: líquen plano pilar área não afetada, fotos referentes ao paciente 4. Aumento 10x. Barra de escala: 200µm.

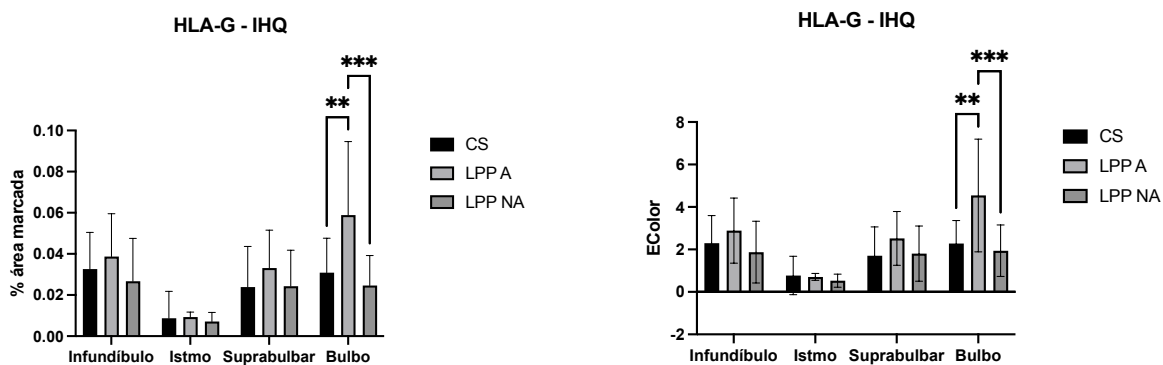
Figura 15 - Características da marcação com anti-HLA-G no folículo piloso por imuno-histoquímica em grande aumento



Fonte: Departamento de Dermatologia – HCFMUSP.

Legenda: Aumento de 400x. Barra de escala: 50µm.

Gráfico 2 - Comparação da expressão de HLA-G por imuno-histoquímica entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar, EColor: expressão da coloração, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

5.5.1 Análise da expressão de TLR2

A marcação do anticorpo anti-TLR2 é ilustrada na figura 16 e descrita a seguir:

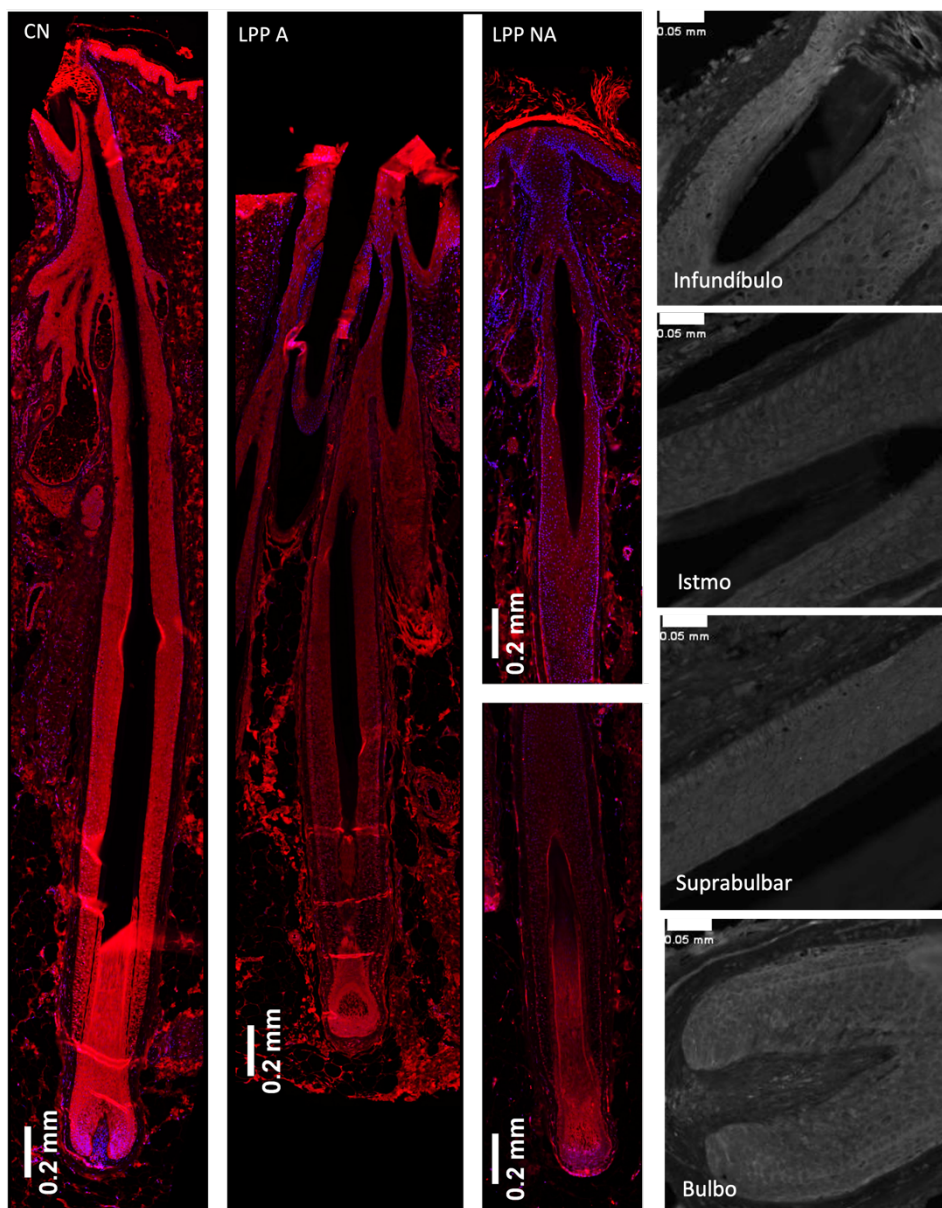
- Presente no infundíbulo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região do istmo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região suprabulbar, padrão citoplasmático;
- Ausente na BRI;
- Presente no bulbo, padrão citoplasmático.

Comparou-se a expressão dos marcadores em cada região nos 3 grupos, aferida como intensidade média de pixel por área em unidades arbitrárias. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0077$).

No teste de comparação múltipla de Tukey a intensidade de expressão no bulbo foi maior nos controles em relação a área afetada ($p = 0,0172$) e em relação a área não afetada ($p = 0,0023$). Não houve diferença estatística entre as áreas afetadas e não afetada ($p = 0,8475$) (Gráfico 3).

A expressão de TLR2 no istmo da área afetada não teve correlação estatisticamente significativa com o LPPAI ($p = 0,05927$) nem com a intensidade do infiltrado inflamatório ($p = 0,8151$).

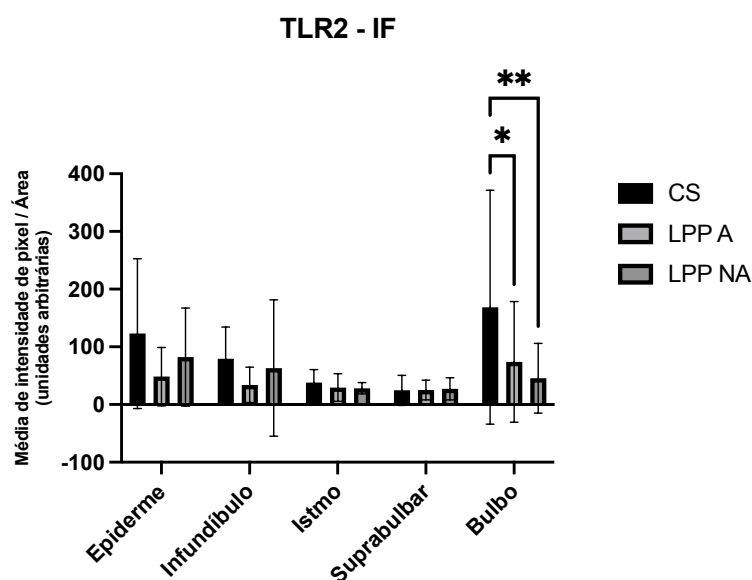
Figura 16 - Imunofluorescência direta com anti-TLR2 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. O CS corresponde ao controle 1 e o LPP ao paciente 11. Barras de escala: 0.2mm e 0.05mm.

Gráfico 3 - Comparação da expressão de TLR2 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

5.5.2 Análise da expressão de TLR3

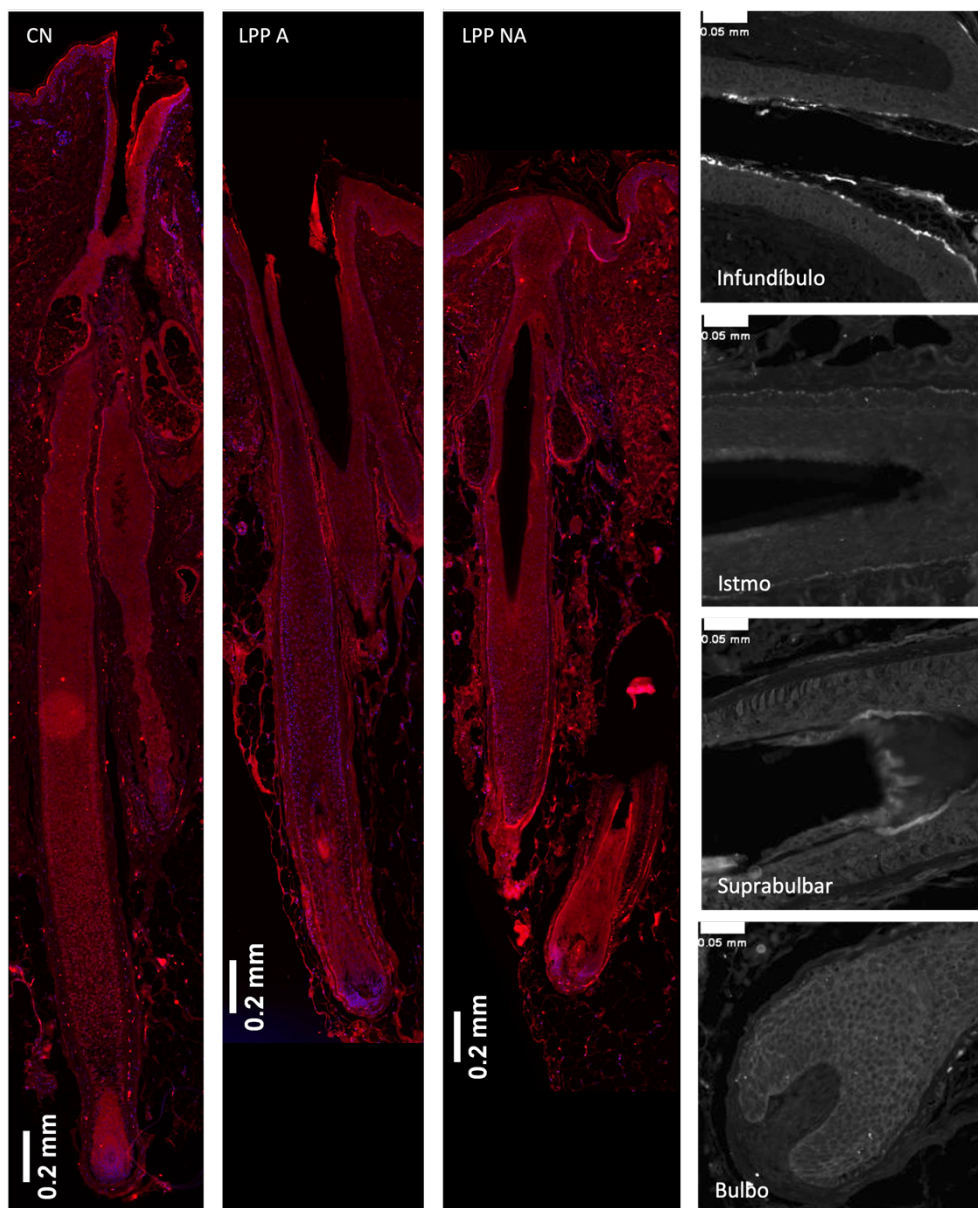
A marcação do anticorpo anti-TLR3 é ilustrada na figura 17 e descrita a seguir:

- Presente no infundíbulo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região do istmo, padrão citoplasmático, mais evidente na camada basal da BRE em padrão pontilhado;
- Presente na BRE na região suprabulbar, padrão citoplasmático;
- Ausente na BRI;
- Presente no bulbo, padrão citoplasmático.

Comparou-se a expressão dos marcadores em cada região nos 3 grupos, aferida como intensidade média de pixel por área em unidades arbitrárias. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). No teste de comparação múltipla de Tukey a intensidade de expressão no istmo foi maior nos controles em relação a área afetada ($p < 0,0001$) e em relação a área não afetada ($p = 0,0001$). Também houve maior intensidade de expressão no istmo na área não afetada em relação a área afetada ($p = 0,0039$) (Gráfico 5).

Encontrou-se correlação forte negativa entre a expressão de TLR3 no istmo e o LPPAI ($r = -0,7038$ e $p = 0,0285$). Não houve correlação estatisticamente significativa com a intensidade do infiltrado inflamatório ($p = 0,6881$) (Gráfico 6).

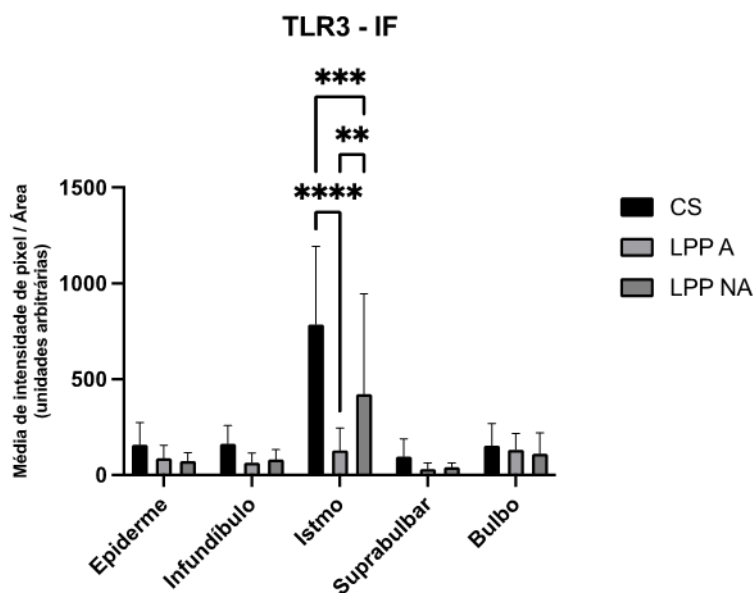
Figura 17 - Imunofluorescência direta com anti-TLR3 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. O CS corresponde ao controle 1 e o LPP ao paciente 11. Barras de escala: 0.2mm e 0.05mm.

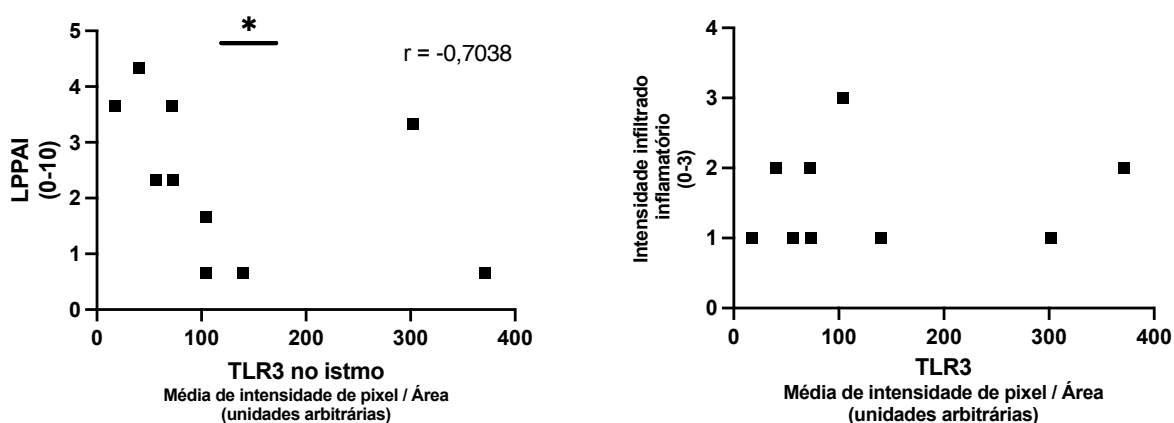
Gráfico 4 - Comparação da expressão de TLR3 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Gráfico 5 - Análises de correlação entre as expressões de TLR3 no istmo e o índice de atividade de líquen plano pilar e intensidade do infiltrado inflamatório



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: LPPAI: índice de atividade de líquen plano pilar.

5.5.3 Análise da expressão de TLR4

A marcação do anticorpo anti-TLR4 é ilustrada na figura 18 e descrita a seguir:

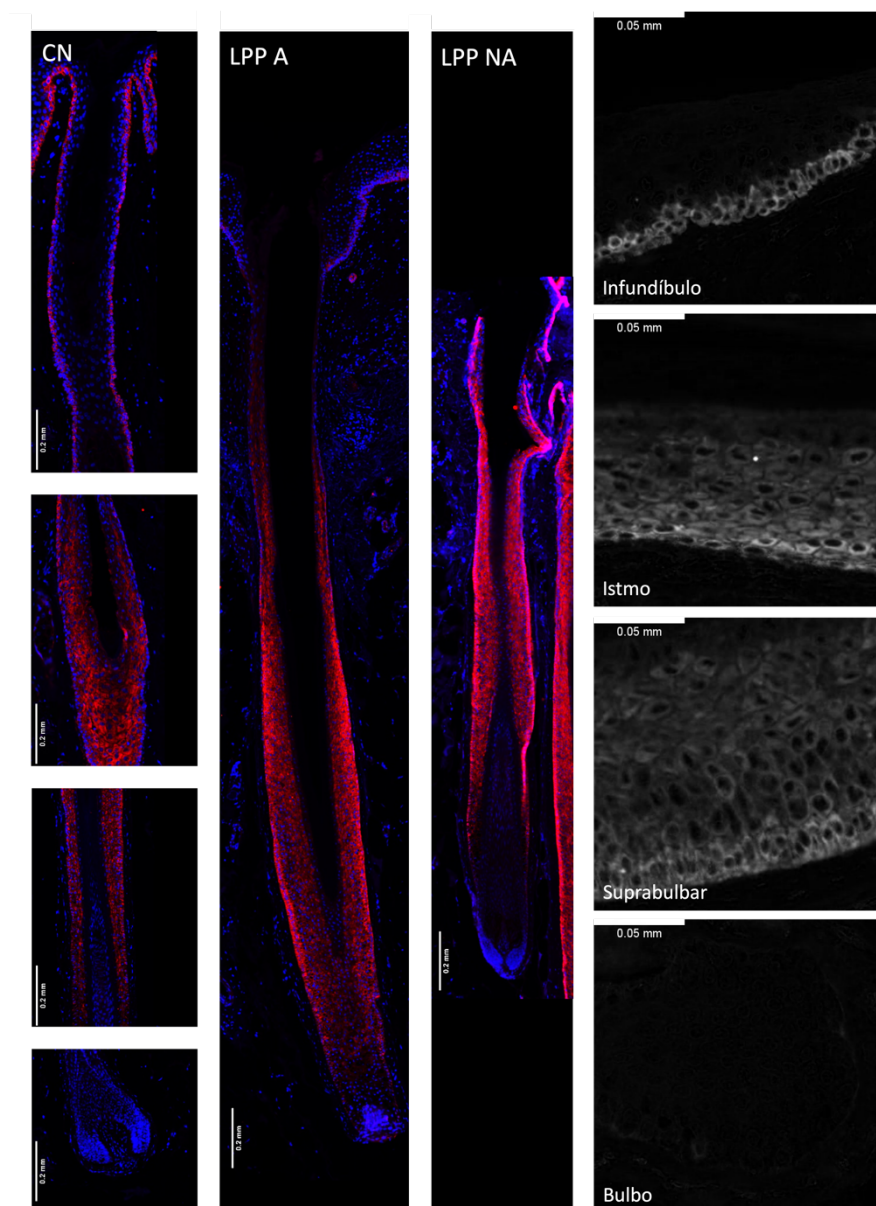
- Presente na camada basal no infundíbulo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região do istmo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região suprabulbar, padrão citoplasmático;
- Discreta na BRI, padrão citoplasmático;
- Ausente no bulbo e haste capilar.

Comparou-se a expressão dos marcadores em cada região nos 3 grupos, aferida como intensidade média de pixel por área em unidades arbitrárias. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0198$).

No teste de comparação múltipla de Tukey a intensidade de expressão na epiderme foi maior nos controles em relação a área afetada ($p = 0,0311$) e área não afetada ($p = 0,0078$). Não houve diferença estatística entre as áreas de LPP ($p = 0,9107$). A intensidade de expressão no infundíbulo foi maior nos controles em relação a área afetada ($p = 0,0183$). Não houve diferença estatística entre os controles e as áreas não afetadas, ($p = 0,4872$) nem entre as áreas afetada e não afetada ($p = 0,2301$) (Gráfico 7).

A expressão de TLR4 no istmo da área afetada não teve correlação estatisticamente significativa com o LPPAI ($p = 0,7211$) nem com a intensidade do infiltrado inflamatório ($p = 0,8151$).

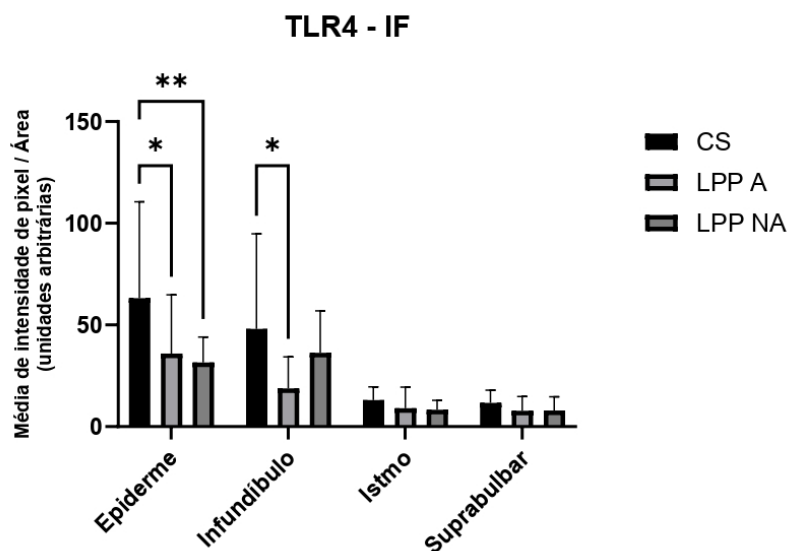
Figura 18 - Imunofluorescência direta com anti-TLR4 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. O CS corresponde ao controle 1 e o LPP ao paciente 11. Barras de escala: 0.2mm e 0.05mm.

Gráfico 6 - Comparação da expressão de TLR4 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. * $p \leq 0.05$.

5.5.4 Análise da expressão de TLR5

A marcação do anticorpo anti-TLR5 é ilustrada na figura 19 e descrita a seguir:

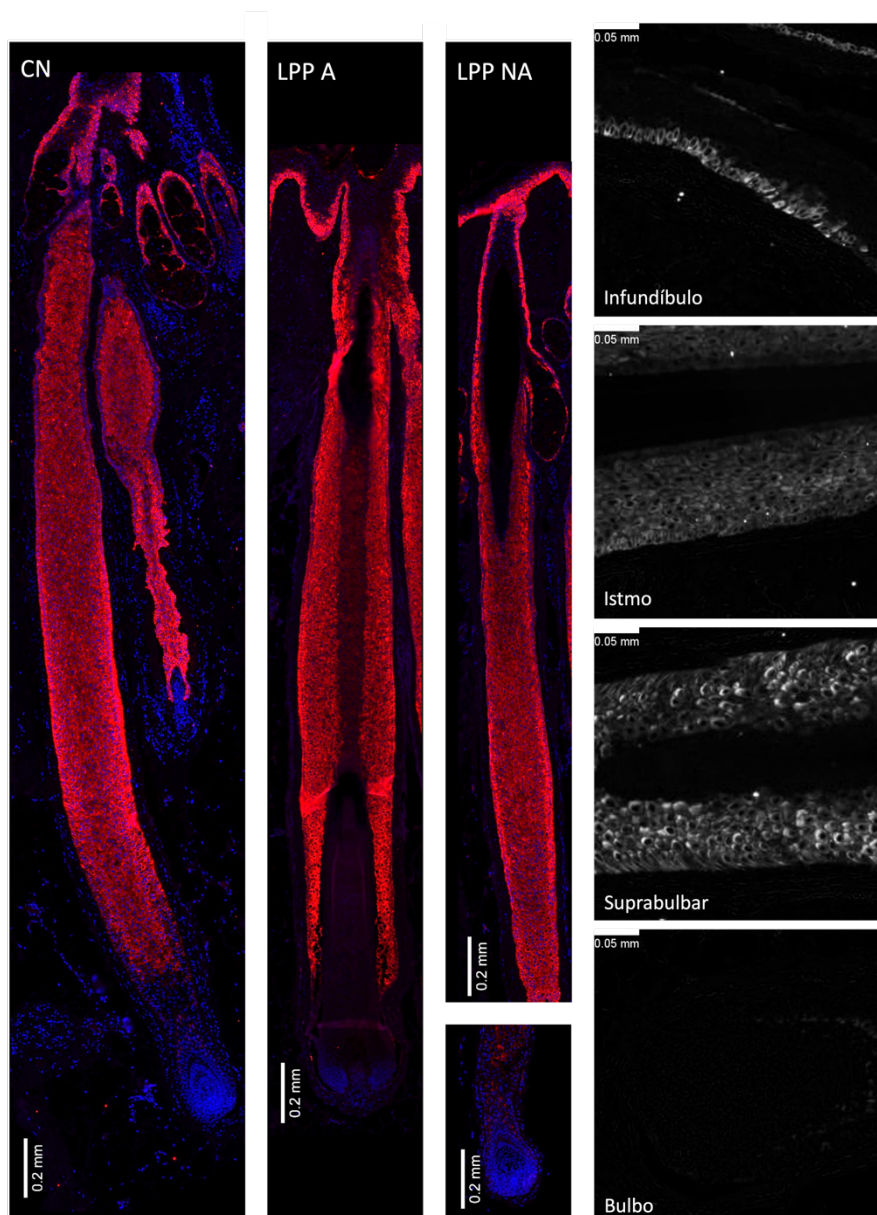
- Presente na camada basal no infundíbulo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região do istmo, padrão citoplasmático;
- Presente na BRE na região suprabulbar, padrão citoplasmático;
- Discreta na BRI, padrão citoplasmático;
- Ausente no bulbo e haste capilar.

Comparou-se a expressão dos marcadores em cada região nos 3 grupos, aferida como intensidade média de pixel por área em unidades arbitrárias. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0003$).

No teste de comparação múltipla de Tukey a intensidade de expressão na epiderme foi maior nos controles em relação a área afetada ($p = 0,0233$). Não houve diferença estatística na epiderme entre os controles e as áreas não afetadas ($p = 0,1209$), nem entre as áreas afetadas e não afetada ($p = 0,7458$). A intensidade de expressão no infundíbulo foi maior nos controles em relação a área afetada ($p = 0,0113$) e não afetada ($p = 0,0436$). Não houve diferença estatística no infundíbulo entre as áreas afetadas e não afetadas ($p = 0,8017$) (Gráfico 8).

A expressão de TLR5 no istmo da área afetada não teve correlação estatisticamente significativa com o LPPAI ($p = 0,6791$) nem com a intensidade do infiltrado inflamatório ($p = 0,8952$).

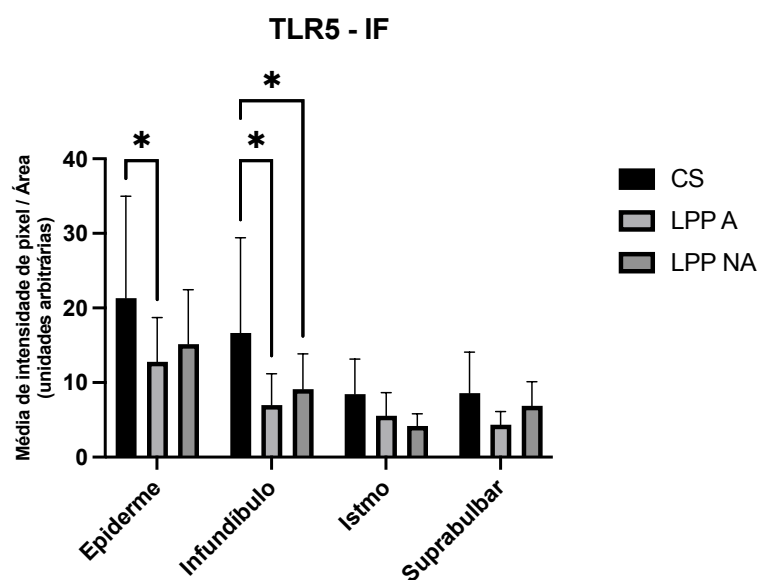
Figura 19 - Imunofluorescência direta com anti-TLR5 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. O CS corresponde ao controle 1 e o LPP ao paciente 11. Barras de escala: 0.2mm e 0.05mm.

Gráfico 7 - Comparação da expressão de TLR5 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. * $p \leq 0.05$.

5.5.5 Análise da expressão de Cav-1

A marcação do anticorpo anti-Cav-1 é ilustrada na figura 20 e descrita a seguir:

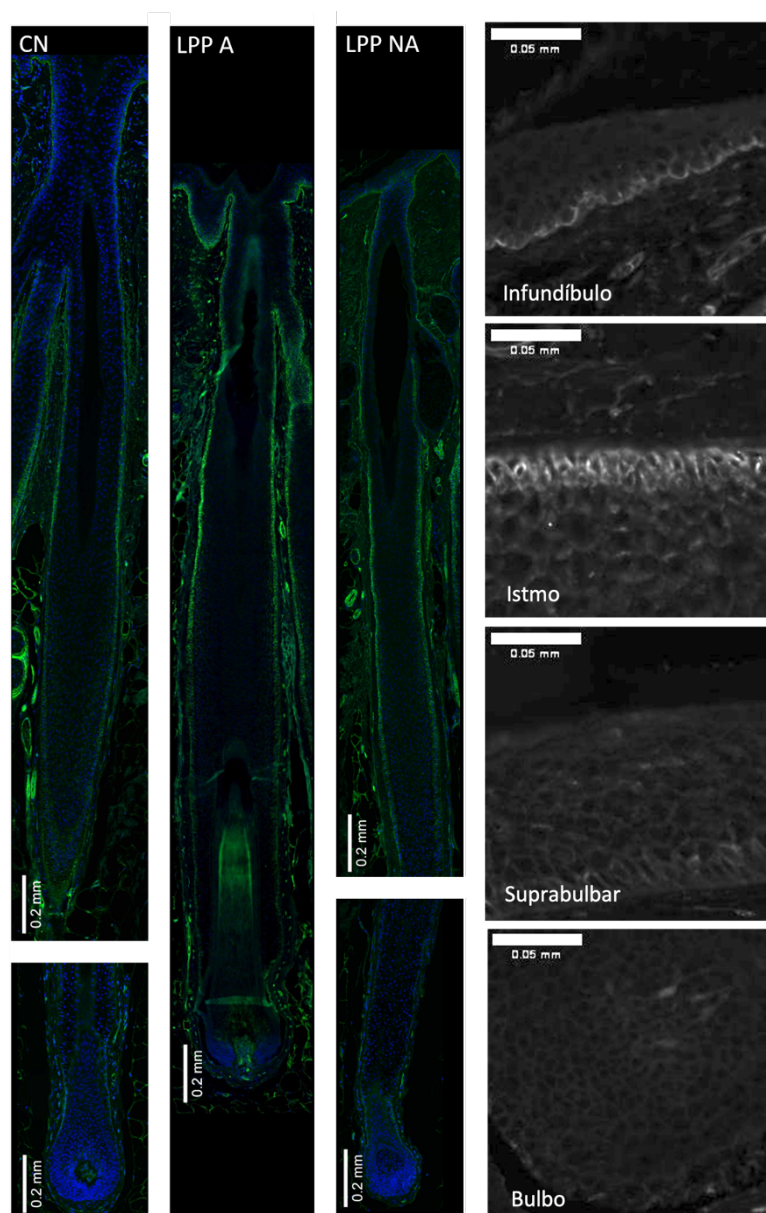
- Presente na camada basal do infundíbulo, padrão membranoso;
- Presente na camada basal da BRE na região do istmo, padrão membranoso;
- Fracamente positiva na BRE na região suprabulbar, padrão membranoso;
- Ausente na BRI;

- Fracamente positiva no bulbo, padrão membranoso.

Comparou-se a expressão dos marcadores em cada região nos 3 grupos, aferida como intensidade média de pixel por área em unidades arbitrárias. O teste ANOVA não apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1042$) (Gráfico 9).

A expressão de Cav-1 no istmo da área afetada não teve correlação estatisticamente significativa com o LPPAI ($p = 0,4875$) nem com a intensidade do infiltrado inflamatório. ($p = 0,8040$).

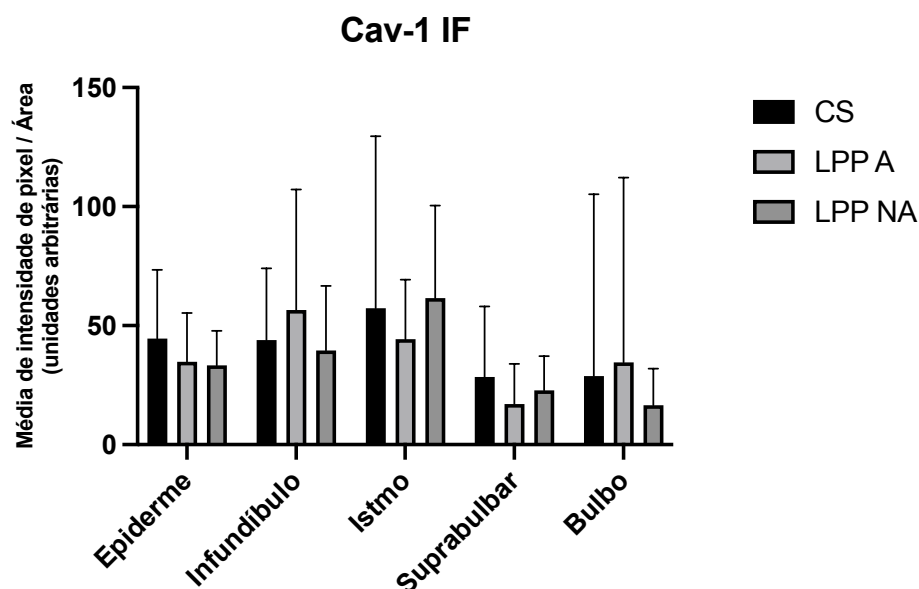
Figura 20 - Imunofluorescência direta com anti-Cav-1 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada de pacientes com líquen plano pilar



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. O CS corresponde ao controle 11 e o LPP ao paciente 11. Barras de escala: 0.2mm e 0.05mm.

Gráfico 8 - Comparação da expressão de Cav-1 por imunofluorescência direta entre controles saudáveis, pacientes de líquen plano pilar em área afetada e não afetada nas partes do folículo piloso



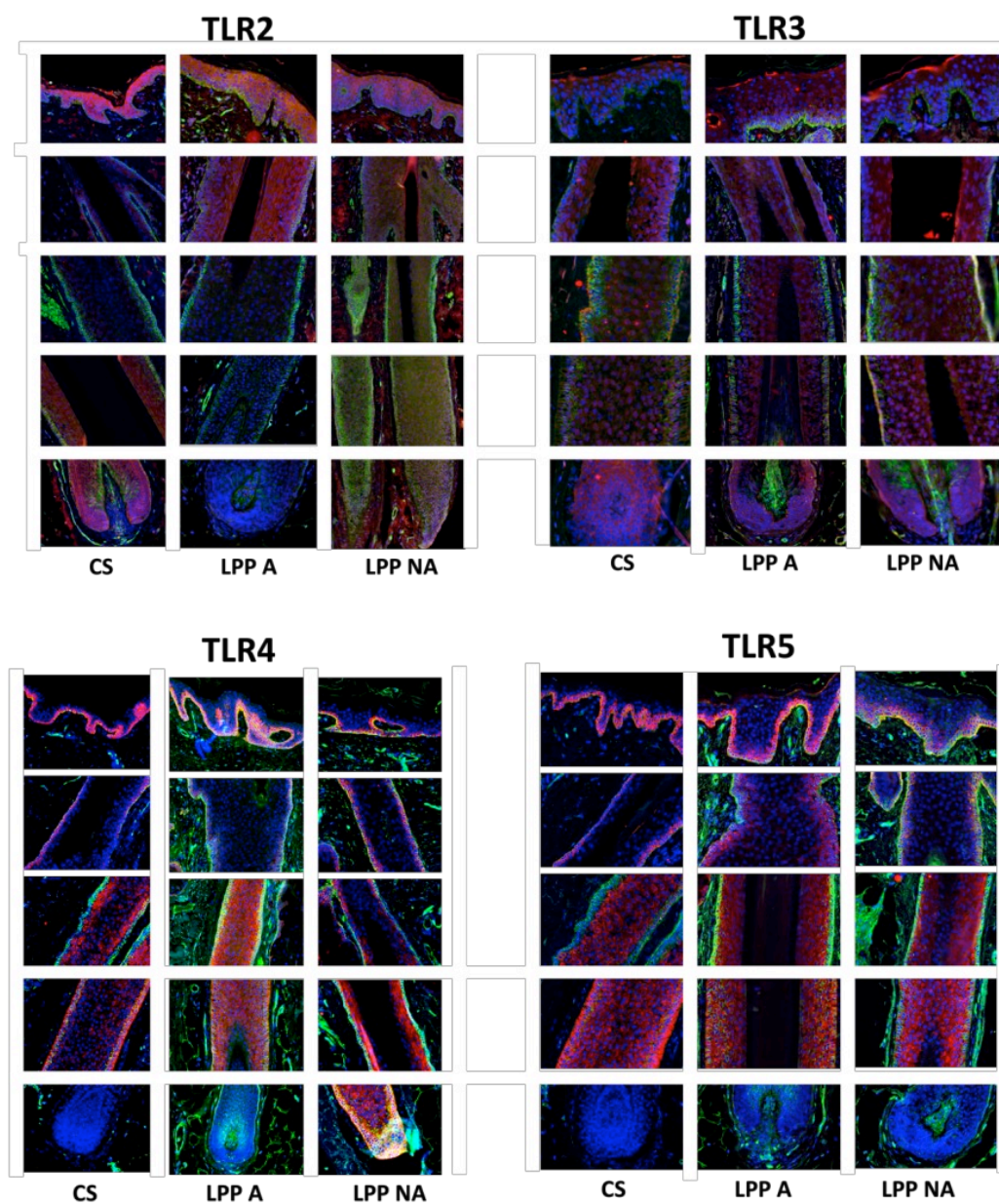
Fonte: Desenvolvido pela autora, 2023.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar.

5.5.6 Análise da dupla marcação de anti-Cav-1 e anti-TLR 2, 3, 4 e 5 no folículo piloso

As reações de IFD foram padronizadas com o anticorpo primário anti-Cav1 hospedeiro em coelho e anti-TLRs hospedeiro em camundongo. Os anticorpos secundários utilizados foram AlexaFluor 488 anti-coelho e AlexaFluor 594 anti-camundongo de modo que a marcação em verde correspondesse a Cav-1 e as em vermelho correspondessem ao grupo de TLRs. A coloração azul corresponde ao DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) que marca regiões de DNA ricas em adenina-timina (núcleo celular). A coexpressão dos marcadores foi mostrada em amarela, vista discretamente com TLR3 em área não afetada e com TLR4 (figura 21).

Figura 21 - Imunofluorescência direta com dupla marcação de anti-Cav-1 e anti TLR2, 3, 4 e 5 no couro cabeludo normal e em área afetada e não afetada por líquen plano pilar



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami.

Legenda: CS: controles saudáveis, LPP A: área afetada por líquen plano pilar, LPP NA: área não afetada por líquen plano pilar. Fluorescência vermelha corresponde aos TLRs, fluorescência verde corresponde a Cav-1, fluorescência azul corresponde a DNA. Devido aos diferentes tamanhos dos folículos pilosos as fotos foram tiradas em aumentos diferentes.

6 DISCUSSÃO

O LPP é uma doença rara e estigmatizante. Apesar do grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, o LPP e as ACP permanecem desconhecidas para a população e para a comunidade médica e científica. Os sintomas de dor, prurido e queimação, bem como a perda irreversível dos cabelos e as consequências sobre a autoestima e relações sociais são pouco valorizadas frente a outras doenças, inclusive dentro da dermatologia. Os estudos sobre LPP são escassos na literatura e seus mecanismos fisiopatogênicos ainda pouco conhecidos. Além disso, devemos considerar as dificuldades técnicas inerentes ao estudo do FP: um órgão composto por diversos tipos celulares especializados, que se modifica ciclicamente e está em constante interação com a derme, rede vascular, neural, anexos cutâneos e o meio externo. Até mesmo o comportamento fisiológico do FP humano é pouco conhecido. Neste contexto, este estudo se propôs a descrever a expressão de marcadores teciduais não só em estado de doença mas também em área clinicamente não afetada, potencialmente predisposta à doença, e em controles sem doença.

A amostra de pacientes de LPP deste estudo é análoga à descrita na literatura, com predomínio de mulheres na faixa dos 50 anos. Difere da literatura pela maior presença de pardos, provavelmente representativa da maior miscigenação do Brasil. Há grande variação no tempo referido de história de doença (0,5 a 26 anos: média de 5,05 anos, mediana de 2,75 anos), um dado pouco presente nas séries de caso publicadas, mas relevante, uma vez que os dados sobre a história natural da doença são escassos^{6,41}. Neste trabalho não houve correlação entre atividade de doença medido pelo LPPAI e intensidade do infiltrado inflamatório com tempo referido de história de doença. Chierigato et al. (2003)³³ reportaram uma duração média de 13 meses em 30 pacientes com LPP na Itália, mas não correlacionou este dado com outras variáveis.

A avaliação anatomopatológica das áreas afetadas de LPP reafirmou os principais achados característicos da doença que são alterações focalizadas no FP, em especial no istmo. Todas as amostras de área afetada exibiam infiltrado

inflamatório ao redor do istmo de intensidades leve (5/10) a intensa (2/10). Em comparação, das 10 amostras de área não afetada, 5 apresentavam peristmite, sendo 1 moderada e 4 peristmite leve; e as outras 5 amostras não apresentavam infiltrado inflamatório. Estes resultados estão em concordância com a literatura que considera que as áreas não afetadas clinicamente possam apresentar alterações patológicas na histologia e que o LPP seja um processo mais generalizado, que envolve todo o couro cabeludo¹⁶⁷.

Um outro achado característico do LPP e suas variantes é a perda/ausência de glândulas sebáceas⁵. Este elemento não foi avaliado neste estudo porque exige cortes transversais das amostras, que possibilitam o exame de todo o fragmento. Neste estudo optou-se pelos cortes longitudinais com o objetivo representar as diversas partes do FP em menos lâminas, sem prejuízo na avaliação das características diagnósticas do LPP^{168,169}. Nos nossos cortes observou-se a presença de infiltrado inflamatório ao redor das glândulas sebáceas em 3/10 casos de área afetada, 3/10 casos de área não afetada e 2/11 controles saudáveis. Estes resultados estão de acordo com o publicado por Al-Zaid et al. (2011)¹⁷⁰ que concluíram que a inflamação das glândulas sebáceas era mais frequente nas ACP mas não específica, sendo também identificada em alopecias não cicatriciais.

Inesperadamente, o estudo dos controles revelou que 4/11 amostras apresentavam infiltrado linfo-histiocitário perifolicular leve na região do infundíbulo e 4/11 na região do istmo. Outros achados considerados patológicos também foram identificados como hiperqueratose periosteal em 1/11, degeneração vacuolar do epitélio folicular em 2/11, infiltrado perifolicular rechaçado por fibrose em 4/11 e fibrose eosinofílica em 4/11. Doche et al. (2018)¹⁶⁷ também avaliaram fragmentos de couro cabeludo de 11 controles saudáveis em duas regiões e encontrou inflamação perifolicular leve associada à espongirose em 36% (n = 4) das amostras anteriores e 18% (n = 2) das posteriores. Os autores relacionaram os achados a possível dermatite seborreica leve e descrevem que não havia inflamação linfocítica perístmica, fibrose perifolicular nem depósitos de mucina nas amostras dos controles. Estes resultados reforçam a necessidade de maior conhecimento sobre o couro cabeludo normal. Por ser uma interface com o meio externo, o FP naturalmente responde aos estímulos

com recrutamento de células imunes e alterações inflamatórias e a identificação de peristrite leve não é critério definitivo para o diagnóstico de LPP pois pode ser encontrado em couro cabeludo normal.

Em relação ao estudo dos marcadores escolhidos, iniciaremos a discussão pelo HLA-G, realizado através de IHQ. O papel do HLA-G se expande rapidamente na oncologia, mas permanece limitado na imunologia da pele e dos anexos. Nos poucos estudos publicados, a expressão da proteína na pele foi detectada em estados patológicos, curiosamente em psoríase e dermatite atópica, doenças consideradas modelos de polos opostos de imunidade, respectivamente Th1 e Th2. Na opinião de alguns autores, a explicação estaria no fato de que a expressão de HLA-G é induzida por diferentes citocinas, inclusive IFN- γ e IL10, que possuem papéis antagônicos em estimular e suprimir a resposta inflamatória¹⁷¹. Dentro deste contexto, o HLA-G na pele teria a função de contrabalancear a resposta excessiva em doenças inflamatórias.

Hipoteticamente, o HLA-G poderia estar presente no FP normal, como guardião do IP assim como no feto e na matriz ungueal e/ou poderia estar presente no FP de alopecias como resposta ao ataque inflamatório. Neste estudo a expressão de HLA-G foi detectada em todas as partes do FP, tanto dos controles quanto em área afetada e não afetada de pacientes com LPP. Os achados estão em concordância com trabalhos que detectaram HLA-G no FP normal através de IHQ¹⁵⁴ e mRNA de HLA-G regulado positivamente em culturas de queratinócitos derivados do bulbo e bainhas de FP normais¹⁵². Na comparação entre os grupos, houve diferença estatisticamente significativa apenas na área do bulbo. O bulbo apresentou maior porcentagem de área marcada e EColor na área afetada em relação a não afetada e controles, sem diferença entre os últimos. Este resultado favorece a hipótese do HLA-G estar presente como contrabalanço do ataque inflamatório. Entretanto, o bulbo não é a região alvo do LPP no modelo de doença atual. A presença mais intensa de HLA-G no bulbo na área acometida por LPP provavelmente envolve mecanismo indiretos. Mais estudos com amostras maiores poderão esclarecer a relação de HLA-G com o FP normal e em estados patológicos.

Quanto à avaliação dos outros marcadores por IHQ, as reações anti-TLR2, TLR4 e TLR5 malsucedidas explicitam a dificuldade técnica em padronizar cromógenos alternativos ao DAB. A impraticabilidade de diferenciar a coloração amarronzada do DAB com a melanina promoveu o desenvolvimento de técnicas de despigmentação da melanina e a padronização de outros cromógenos^{172,173}. Neste trabalho foram feitas diversas tentativas de uso do TrueBlue Peroxidase substrate e somente os anticorpos anti-TLR3 e HLA-G tiveram marcação considerada específica. Como alternativa à IHQ usamos o método de IFD. Apesar de mais custosa, a IFD apresenta algumas vantagens em relação a IHQ. A IFD tem uma melhor “relação sinal-ruído” e uma faixa de intensidade da coloração dinâmica mais ampla e linear do que a IHQ, permitindo uma avaliação quantitativa mais acurada¹⁷⁴.

Através de IFD este estudo descreve o padrão de expressão dos TLR 2 e 3 em FP humanos de forma inédita. Previamente, havia descrição apenas do padrão de expressão de TLR 4 e 5 em FP humanos normais¹³³ e de TLR 2, 4 e 5 em FP murinos¹³².

A expressão de TLR2 neste estudo foi observada em todas as regiões do FP, diferentemente do descrito em murinos, nos quais a positividade de marcação de TLR2 é detectada nas porções média e proximal/inferior do FP, com exceção do bulbo e infundíbulo¹³². Em humanos, Pivarcsi et al. (2003) reportaram marcação intensa nos FP através de IHQ mas sem especificar a região avaliada. No artigo publicado há uma figura corresponde à esta afirmação, mas que não contém o bulbo; a imagem representa um corte transversal de um FP com BRE e BRI¹⁷⁵. Dessa forma, a expressão de TLR2 no bulbo ainda não foi explorada. Ademais, na comparação entre os grupos a intensidade de expressão no bulbo foi maior nos controles em relação a área afetada e em relação a área não afetada, sem diferença entre as últimas.

O TLR2 é o mais estudado do grupo nas doenças dermatológicas e liquenoides, sendo que no LPO é considerado como peça-chave nos mecanismos da fisiopatológicos da doença¹²⁰. Porém, sua função no FP permanece desconhecida.

Em uma investigação sobre cicatrização de feridas com camundongos TLR2-*knockout* a deleção de TLR2 não teve efeitos sobre a proliferação das células tronco foliculares ou no potencial de cicatrização¹⁷⁶.

A expressão de TLR3 em FP humanos foi encontrada em todas as partes do FP tanto por IHQ quanto por IFD. Os padrões de marcação nos dois métodos foram semelhantes mas apenas na IFD houve diferença na intensidade de expressão, possivelmente pelas limitações da IHQ. A expressão no istmo foi diferente entre os 3 grupos, sendo mais intensa nos controles, intermediária na área não afetada e menor na área afetada. Além disso, houve correlação forte negativa entre a expressão de TLR3 no istmo e o LPPAI.

A relação do TLR3 com o FP está sendo recentemente explorada. Tradicionalmente admite-se que o ligante de TLR3 é RNA de fita-dupla, o que o caracteriza como importante detector de infecção viral. Porém, ferimentos físicos ou induzidos por radiação ultravioleta que levem à necrose liberam DAMPs, incluindo RNA de fita-dupla¹⁷⁷. A ativação do TLR3 por RNA de fita-dupla seria um dos primeiros eventos responsáveis pela neogênese do FP induzida por feridas, um fenômeno que ocorre na pele de mamíferos adultos, em que FP totalmente funcionais são regenerados no centro de grandes feridas de espessura total^{178,179}. A ativação de TLR3 leva à indução da via de síntese de ácido retinóico que sabidamente está ativada na neogênese folicular de murinos. É também o mecanismo pelo qual lasers de rejuvenescimento induzem assinaturas de expressão gênica para RNA de fita-dupla e síntese de ácido retinóico em humanos¹⁸⁰. Isto posto, os resultados deste estudo corroboram que a presença de TLR3 está associada à normalidade. A diminuição de expressão de TLR3 na área predisposta a doença (área não afetada) e a perda na área afetada podem estar associadas à perda de capacidade de regeneração do FP.

No nosso estudo o padrão de expressão de TLR4 e TLR5 foi semelhante: na epiderme e infundíbulo há positividade marcadamente na camada basal e após a inserção da glândula sebácea a positividade é vista em todas as camadas da BRE e é ausente no bulbo. Esta é uma caracterização mais detalhada da previamente descrita por Reithmayer et al. (2009) por IHQ¹³³. Os autores descrevem que o TLR4

é encontrado com intensidade moderada nas camadas suprabasais da BRE na parte distal/superior, com fraca intensidade no meio, e é ausente na região proximal/inferior e o TLR5 é encontrado com fraca a moderada intensidade por toda BRE do FP, sendo que na parte distal/superior o TLR5 é mais intenso na camada basal. Em relação a expressão na BRI, nossas amostras apresentaram fraca expressão de ambos TLR 4 e 5, diferente dos resultados de Reithmayer que descrevem aumento da expressão de TLR4 na BRI, na transição entre a parte proximal/inferior e média do FP em 80% dos FP; e também expressão moderada a intensa de TLR5 por toda BRI¹³³.

A expressão de TLR4 e TLR5 diferiu entre os grupos na epiderme e infundíbulo, regiões consideradas como não sendo o principal alvo do LPP. Estes resultados podem ser explicados pela complexa interação do FP com o microbioma. Considerando que os principais ligantes de TLR4 e TLR5 são LPS e a flagelina, esses receptores são indispensáveis na defesa contra patógenos, manutenção da tolerância a bactérias comensais e indução de vias de reparo. Mudanças no microbioma podem estar relacionadas às diferenças de expressão nas principais áreas de interação do FP: a epiderme e o infundíbulo. Estudos investigando o microbioma e disbiose ainda apresentam diversas limitações, mas dados incipientes mostraram diferenças na composição bacteriana da pele do couro cabeludo e de FP em área afetada e não afetada de pacientes com AFF e LPP e controles¹⁸¹. O gênero mais abundante nas áreas lesionais e não lesionais de pacientes com LPP e AFF foi *Staphylococcus*, enquanto *Lawsonella* dominou nos controles e em pacientes com alopecia areata. Também houve diferença na razão de Firmicutes para Actinobactérias. Novos estudos poderão esclarecer se a disbiose é causa ou consequência do processo patológico¹⁸². Este estudo, pelo não envolvimento do istmo, sugere que a relação com o microbioma não seja causa da doença, ou que possa se relacionar através de mecanismos indiretos.

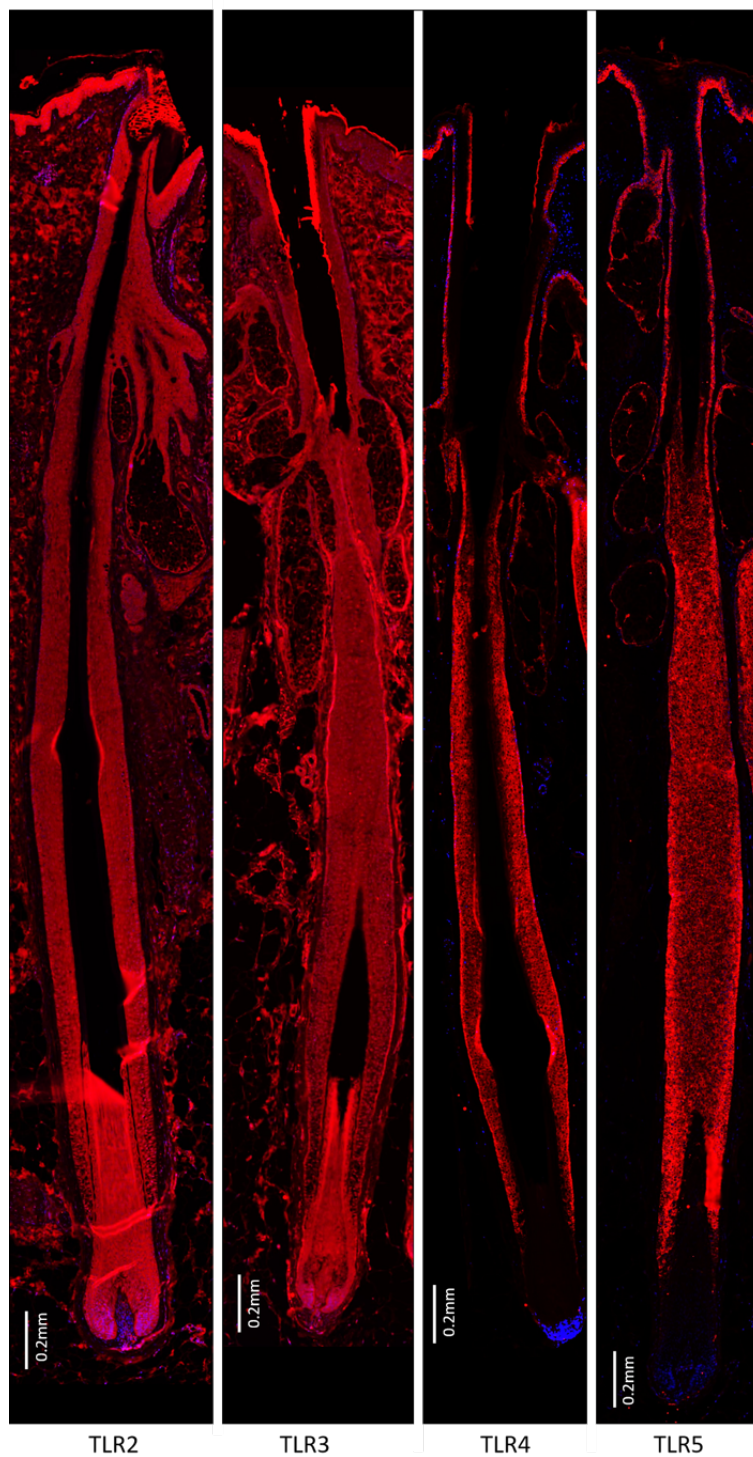
A figura 22 ilustra os diferentes padrões de expressão dos TLR 2, 3, 4 e 5 de acordo com cada região do FP por IFD.

Em relação à expressão de Cav-1, este estudo confirma a presença de marcação no FP de couro cabeludo humano conforme descrito anteriormente¹⁶⁰, porém sem diferença entre os grupos. Jozic et al. (2021)¹⁶⁰ descreveram a marcação

de Cav-1 nas células mais externas da BRE em colocalização com K15 e CD34, marcadores conhecidos de células-tronco foliculares. Com esta metodologia, encontraram expressão significativamente elevada em FP de pacientes com AFF. Contudo, nesta amostra com pacientes de LPP este resultado não se confirmou, possivelmente porque as doenças LPP e AFF são diferentes ou porque a marcação neste estudo foi feita com os TLRs, o que poderia ter prejudicado a seleção mais precisa do local de células-tronco foliculares.

A coexpressão e a interação funcional entre Cav-1 e os receptores TLRs já foram descritos em especial em TLR4 nos macrófagos^{183,184} mas neste estudo não houve coexpressão significativa entre os TLRs e Cav-1.

Figura 22 - Diferentes padrões de expressão dos TLR 2, 3, 4 e 5 no folículo piloso por imunofluorescência direta



Fonte: Dr. Phillip Frost Department of Dermatology and Cutaneous Surgery, Miller School of Medicine, University of Miami.

Legenda: Barra de escala: 0.2mm.

7 CONCLUSÕES

O LPP é uma enfermidade estigmatizante e ainda pouco compreendida com relação à sua fisiopatologia. Este estudo visou explorar a expressão cutânea de marcadores envolvidos na inflamação, como os TLRs, HLA-G e Cav-1 em pacientes com o diagnóstico de LPP clássico. Nossos achados nos permitiram concluir que:

- a) Há correlação forte negativa de TLR3 com o LPPAI. As áreas clinicamente não afetadas de LPP podem apresentar infiltrado inflamatório ao redor do istmo de intensidade equivalente ou menor que da área afetada. As amostras de controles saudáveis podem apresentar infiltrado inflamatório leve no infundíbulo e no istmo, degeneração vacuolar do epitélio folicular, hiperqueratose periosteal, infiltrado perifolicular rechaçado por fibrose e fibrose eosinofílica;
- b) Quanto à expressão tecidual dos marcadores através de IHQ, verificamos que a expressão de HLA-G foi detectada em todas as partes do FP. No bulbo foi maior na área afetada em relação a área não afetada e em relação aos controles saudáveis, sem diferença entre os últimos. A expressão de TLR3 por IHQ apresentou padrão e localização semelhantes à IFD, e não houve diferença entre áreas afetadas, não afetadas e controles saudáveis;
- c) Quanto à descrição da expressão tecidual dos marcadores nas diferentes partes do FP através da IFD, observamos que:
 - TLR2 e TLR3 têm padrão citoplasmático presente em todas as camadas do FP, exceto na BRI;
 - TLR2 no bulbo tem menor intensidade de expressão nas áreas afetadas e não afetadas em relação ao FP de controles saudáveis;
 - TLR3 no istmo tem expressão mais intensa nos controles, intermediária na área não afetada e menos intensa na área afetada;

- TLR4 e TLR5 têm padrão citoplasmático na camada basal do infundíbulo, em todas as camadas da BRE na região de istmo e suprabulbar, sendo discreta na BRI, e ausente no bulbo e haste capilar;
- TLR4 na epiderme tem menor intensidade de expressão nas áreas afetada e não afetada por LPP em relação aos controles saudáveis; no infundíbulo tem menor intensidade na área afetada em relação aos controles saudáveis;
- TLR5 na epiderme tem menor intensidade de expressão na área afetada por LPP do que nos controles; no infundíbulo tem menor intensidade nas áreas afetada e não afetada em relação aos controles saudáveis;
- Cav-1 tem padrão membranoso na camada basal no infundíbulo, camada basal da BRE no istmo, ausente na BRI e fracamente positiva na BRE da região suprabulbar e bulbo, sem diferença entre os grupos. Não há coexpressão significativa entre os TLRs e Cav-1 no FP.

Os resultados confirmam que HLA-G, TLR 2, 3, 4 e 5 e Cav-1 estão presentes no FP, com expressão variável quanto à intensidade, padrão e região do FP. Dentre eles destaca-se o TLR3 que é expresso no istmo dos controles saudáveis, está diminuído na área não afetada e tem ainda menor expressão na área afetada. Pesquisas futuras poderão confirmar seu papel na fisiopatologia do LPP e sua relevância como marcador diagnóstico e prognóstico desta enfermidade.

8 REFERÊNCIAS

1. Olsen EA, et al. Summary of North American Hair Research Society (NAHRS) - sponsored workshop on cicatricial alopecia, Duke University Medical Center, February 10 and 11, 2001. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(1):103-10.
2. Kang H, et al. Lichen planopilaris. *Dermatol Ther.* 2008;21(4):249-56.
3. Alirezaei P, et al. Compared to controls, individuals with lichen planopilaris have more depression, a lower self-esteem, and a lower quality of life. *Neuropsychobiology.* 2019;78(2):95-103.
4. Somani N, Bergfeld WF. Cicatricial alopecia: classification and histopathology. *Dermatol Ther.* 2008;21(4):221-37.
5. Tandon YK, et al. A histologic review of 27 patients with lichen planopilaris. *J Am Acad Dermatol.* 2008;59(1):91-8.
6. Bolduc C, Sperling LC, Shapiro J. Primary cicatricial alopecia: lymphocytic primary cicatricial alopecias, including chronic cutaneous lupus erythematosus, lichen planopilaris, frontal fibrosing alopecia, and Graham-Little syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(6):1081-99.
7. Schmidt-Ullrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays.* 2005;27(3):247-61.
8. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol.* 2009;19(3):R132-42.
9. Buffoli B, et al. The human hair: from anatomy to physiology. *Int J Dermatol.* 2014;53(3):331-41.
10. Rishikaysh P, et al. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):1647-70.
11. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev.* 2001;81(1):449-94.
12. Sperling LC, Cowper SE, Knopp EA. An atlas of hair pathology with clinical correlations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2012.
13. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 1948;29(1):58-69.
14. Westgate GE, Craggs RI, Gibson WT. Immune privilege in hair growth. *J Invest Dermatol.* 1991;97(3):417-20.

15. Bertolini M, et al. Hair follicle immune privilege and its collapse in alopecia areata. *Exp Dermatol*. 2020;29(8):703-25.
16. Ito T, et al. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am J Pathol*. 2004;164(2):623-34.
17. Paus R, et al. The hair follicle and immune privilege. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2003;8(2):188-94.
18. Meyer KC, et al. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol*. 2008;159(5):1077-85.
19. Wang X, et al. Hair follicle mesenchyme-associated PD-L1 regulates T-cell activation induced apoptosis: a potential mechanism of immune privilege. *J Invest Dermatol*. 2014;134(3):736-45.
20. Sachs W, De Ore G. Lichen planopilaris: lichen planus et acuminatus atrophicans (feldman) and lichen spinulosus and folliculitis decalvans (little). *Arch Derm Syphilol*. 1942;45(6):1081-93.
04. Somani N, Bergfeld WF. Cicatricial alopecia: classification and histopathology. *Dermatol Ther*. 2008;21(4):221-37.
21. Vañó-Galván S, et al. Frontal fibrosing alopecia: a multicenter review of 355 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(4):670-8.
22. Kanti V, et al. Frontal fibrosing alopecia: demographic and clinical characteristics of 490 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(10):1976-83.
23. Tziotzios C, et al. Frontal fibrosing alopecia should be renamed to lichen planopilaris of Kossard. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(2):e53.
24. Saceda-Corralo D, et al. Clinical description of frontal fibrosing alopecia with concomitant lichen planopilaris. *Ski Appendage Disord*. 2018;4(2):105-7.
25. Altman J, Perry HO. The variations and course of lichen planus. *Arch Dermatol*. 1961;84(2):179-91.
26. Zinkernagel MS, Med C, Trüeb RM. Fibrosing alopecia in a pattern distribution: patterned lichen planopilaris or androgenetic alopecia with a lichenoid tissue reaction pattern? *Arch Dermatol*. 2000;136(2):205-11.
27. Olsen EA. Female pattern hair loss and its relationship to permanent/cicatricial alopecia: a new perspective. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2005;10(3):217-21.
28. Starace M, et al Diffuse variants of scalp lichen planopilaris: clinical, trichoscopic, and histopathologic features of 40 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(6):1659-67.

29. Manatis-Lornell A, et al. Comorbidities in patients with lichen planopilaris: a retrospective case-control study. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(1):205-8.
30. Nic Dhonncha E, Foley CC, Markham T. The role of hydroxychloroquine in the treatment of lichen planopilaris: a retrospective case series and review. *Dermatol Ther.* 2017;30(3):e12463.
31. Cevasco NC, et al. A case-series of 29 patients with lichen planopilaris: the Cleveland Clinic Foundation experience on evaluation, diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(1):47-53.
32. Jordan CS, et al. Clinicopathologic and immunophenotypic characterization of lichen planopilaris and central centrifugal cicatricial alopecia: a comparative study of 51 cases. *J Cutan Pathol.* 2020;47(2):128-34.
33. Chierigato C, et al. Lichen planopilaris: report of 30 cases and review of the literature. *Int J Dermatol.* 2003;42(5):342-5.
34. Trager MH, et al. Prevalence estimates for lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia in a New York City health care system. *J Am Acad Dermatol.* 2021;84(4):1166-9.
35. Joshi TP, et al. Prevalence of lichen planopilaris in the United States: a cross-sectional study of the all of us research program. *JAAD Int.* 2022;8:69-70.
36. Lim SH, et al. Rapidly increasing incidence and prevalence of lichen planopilaris in an Asian population: a Korean nationwide population-based study. *J Dermatol.* 2022;49(12):1351-3.
37. Mardones F, Shapiro J. Lichen planopilaris in a Latin American (Chilean) population: demographics, clinical profile and treatment experience. *Clin Exp Dermatol.* 2017;42(7):755-9.
38. Ochoa BE, King Jr. LE, Price VH. Lichen planopilaris: Annual incidence in four hair referral centers in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(2):352-3.
39. Vañó-Galván S, et al. Frequency of the types of alopecia at twenty-two specialist hair clinics: a multicenter study. *Ski Appendage Disord.* 2019;5(5):309-15.
40. Christensen KN, Lehman JS, Tollefson MM. Pediatric lichen planopilaris: clinicopathologic study of four new cases and a review of the literature. *Pediatr Dermatol.* 2015;32(5):621-7.
41. Assouly P, Reygagne P. Lichen planopilaris: update on diagnosis and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* 2009;28(1):3-10.
42. Morais KL, et al. Lichen planopilaris with pustules: a diagnostic challenge. *Ski Appendage Disord.* 2018;4(2):61-6.

43. Asz-Sigall D, et al. Linear lichen planopilaris of the face: case report and review. *Ski Appendage Disord*. 2016;2(1-2):72-5.
44. Babahosseini H, et al. Lichen planopilaris: retrospective study on the characteristics and treatment of 291 patients. *J Dermatolog Treat*. 2019;30(6):598-604.
45. Gupta SN, Palceski D. Lichen planopilaris presenting as truncal alopecia: a case presentation and review of the literature. *Cutis*. 2003;72(1):63-6.
46. Baker K, Pehr K. Linear lichen planopilaris of the trunk: first report of a case. *J Cutan Med Surg*. 2006;10(3):136-8.
47. Arshdeep, et al. Lichen planopilaris beyond scalp: a case series with dermoscopy-histopathology correlation. *Int J Dermatol*. 2018;57(11):e127-31.
48. Mehregan DA, Van Hale HM, Muller SA. Lichen planopilaris: clinical and pathologic study of forty-five patients. *J Am Acad Dermatol*. 1992;27(6):935-42.
49. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1999;88(4):431-6.
50. Olszewska M, et al. Vulvovaginal-gingival lichen planus: association with lichen planopilaris and stratified epithelium-specific antinuclear antibodies. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(1):92-6.
51. Rakowska A, et al. Trichoscopy of cicatricial alopecia. *J Drugs Dermatol*. 2012;11(6):753-8.
52. Miteva M, Tosti A. Dermoscopy guided scalp biopsy in cicatricial alopecia. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2013;27(10):1299-303.
53. Estrada BD, et al. Padrão dermatoscópico das alopecias cicatriciais causadas por lúpus eritematoso discoide e líquen plano pilar. *An Bras Dermatol*. 2010;85(2):179-83.
54. Eftekhari H, et al. Dermoscopic features of lichen planopilaris in Northern Iran: a prospective observational study. *Int J Dermatol*. 2019;58(12):1406-14.
55. Fertig RM, et al. Medical comorbidities in patients with lichen planopilaris, a retrospective case-control study. *Int J Dermatol*. 2018;57(7):804-9.
56. Mesinkovska NA, et al. Association of lichen planopilaris with thyroid disease: a retrospective case-control study. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(5):889-92.
57. Brankov N, et al. Comorbid conditions in lichen planopilaris: a retrospective data analysis of 334 patients. *Int J Womens Dermatol*. 2018;4(3):180-4.

58. Joshi TP, et al. Comorbidities associated with lichen planopilaris: a case-control study using the All of Us database. *Int J Dermatol.* 2023;62(7):e396-e398.
59. Lim SH, et al. Prevalence and incidence of comorbid diseases and mortality risk associated with lichen planopilaris: a Korean nationwide population-based study. *Clin Exp Dermatol.* 2023;llad235.
60. Ali S, et al. Vitamin D deficiency among patients with lichen planopilaris or frontal fibrosing alopecia. *JAAD Int.* 2022;8:109-10.
61. Trager MH, et al. Medical comorbidities and sex distribution among patients with lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia: a retrospective cohort study. *J Am Acad Dermatol.* 2021;84(6):1686-9.
62. Ranasinghe GC, Piliang MP, Bergfeld WF. Prevalence of hormonal and endocrine dysfunction in patients with lichen planopilaris (LPP): a retrospective data analysis of 168 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(2):314-20.
63. Harries MJ, et al. Lichen planopilaris is characterized by immune privilege collapse of the hair follicle's epithelial stem cell niche. *J Pathol.* 2013;231(2):236-47.
64. Taylor G, et al. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 2000;102(4):451-61.
65. Mobini N, Tam S, Kamino H. Possible role of the bulge region in the pathogenesis of inflammatory scarring alopecia: lichen planopilaris as the prototype. *J Cutan Pathol.* 2005;32(10):675-9.
66. Imanishi H, et al. Epithelial-to-mesenchymal stem cell transition in a human organ: lessons from lichen planopilaris. *J Invest Dermatol.* 2018;138(3):511-9.
67. Anzai A, et al. Pathomechanisms of immune-mediated alopecia. *Int Immunol.* 2019;31(7):439-47.
68. Paus R, Nickoloff BJ, Ito T. A "hairy" privilege. *Trends Immunol.* 2005;26(1):32-40.
69. Chiang YZ, et al. Lichen planopilaris following hair transplantation and face-lift surgery. *Br J Dermatol.* 2012;166(3):666-70.
70. Crisóstomo MR, et al. Hair loss due to lichen planopilaris after hair transplantation: A report of two cases and a literature review. *An Bras Dermatol.* 2011;86(2):359-62.
71. Alahmari L, et al. Lichen planopilaris with Koebner phenomenon. *JAAD Case Rep.* 2018;4(8):848-50.
72. Robinson G, et al. Sunscreen and frontal fibrosing alopecia: a review. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82(3):723-8.

73. Karnik P, et al. Hair follicle stem cell-specific PPAR γ deletion causes scarring alopecia. *J Invest Dermatol.* 2009;129(5):1243-57.
74. Harries MJ, Paus R. Scarring alopecia and the PPAR- γ connection. *J Invest Dermatol.* 2009;129(5):1066-70.
75. Panicker SP, et al. Sterol intermediates of cholesterol biosynthesis inhibit hair growth and trigger an innate immune response in cicatricial alopecia. *PLoS One.* 2012;7(6):e38449.
76. Dicle O, et al. Differential expression of mTOR signaling pathway proteins in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia. *Acta Histochem.* 2018;120(8):837-45.
77. Doche I, et al. Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor in frontal fibrosing alopecia and lichen planopilaris: a potential pathogenic role for dioxins?: an investigational study of 38 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34(7):e326-e329.
78. Doche I, et al. Evidence for neurogenic inflammation in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia pathogenic mechanism. *Exp Dermatol.* 2019;29(3):282-5.
79. Wang EHC, et al. Primary cicatricial alopecias are characterized by dysregulation of shared gene expression pathways. *PNAS Nexus.* 2022;1(3):pgac111.
80. Hobo A, et al. IL-17-positive mast cell infiltration in the lesional skin of lichen planopilaris: Possible role of mast cells in inducing inflammation and dermal fibrosis in cicatricial alopecia. *Exp Dermatol.* 2018;29(3):273-7.
81. Miteva M, et al. IL-17 expression in the perifollicular fibrosis in biopsies from lichen planopilaris. *Am J Dermatopathol.* 2022;44(12):874-8.
82. Pavlovsky L, et al. Lichen planopilaris is associated with HLA DRB1*11 and DQB1*03 alleles. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(2):177-80.
83. Devjani S, et al. Identifying first-degree family members in patients with frontal fibrosing alopecia and lichen planopilaris in a specialty alopecia clinic. *Int J Womens Dermatol.* 2023;9(3):e088.
84. Vishwanath T, Dhurat R. Cross-sectional study to evaluate the utility of elastic tissue staining in primary cicatricial alopecia. *J Clin Pathol.* 2023;0:1-6.
85. Christoph T, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol.* 2000;142(5):862-73.
86. Nagao K, et al. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol.* 2012;13(8):744-52.

87. Kinoshita M, et al. Downregulation of integrin- α v β 6 on keratinocytes in the scar of lichen planopilaris and folliculitis decalvans: Relevance for the disappearance of epidermal Langerhans cells. *J Dermatol*. 2019;46(7):610-4.
88. Hutchens KA, Balfour EM, Smoller BR. Comparison between Langerhans cell concentration in lichen planopilaris and traction alopecia with possible immunologic implications. *Am J Dermatopathol*. 2011;33(3):277-80.
89. Trachsler S, Trüeb RM. Value of direct immunofluorescence for differential diagnosis of cicatricial alopecia. *Dermatology*. 2005;211(2):98-102.
90. Rácz E, et al. Treatment of frontal fibrosing alopecia and lichen planopilaris: a systematic review. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2013;27(12):1461-70.
91. Harries MJ, Messenger A. Treatment of frontal fibrosing alopecia and lichen planopilaris. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2014;28(10):1404-5.
92. Donati A, et al. Clinical and photographic assessment of lichen planopilaris treatment efficacy. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(3):597-8.
93. Williams J, et al. Treatment patterns for hydroxychloroquine, methotrexate, and mycophenolate mofetil in lichen planopilaris: a retrospective chart review. *J Cutan Med Surg*. 2023;27(4):403-5.
94. Fatemi F, et al. Comparative efficacy study combination of oral methotrexate and prednisolone versus oral methotrexate in patients with lichen planopilaris. *Dermatol Res Pract*. 2022;2022:3792489.
95. Lajevardi V, et al. Efficacy and safety of oral pioglitazone in the management of lichen planopilaris in comparison with clobetasol: a randomized clinical trial. *Dermatol Ther*. 2022;35(11):e15868.
96. Spring P, Spanou Z, Viragh PA. Lichen planopilaris treated by the peroxisome proliferator activated receptor- γ agonist pioglitazone: lack of lasting improvement or cure in the majority of patients. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(5):830-2.
97. Baibergenova A, Walsh S. Use of pioglitazone in patients with lichen planopilaris. *J Cutan Med Surg*. 2012;16(2):97-100.
98. Mesinkovska NA, et al. The use of oral pioglitazone in the treatment of lichen planopilaris. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(2):355-6.
9. Peterson EL, et al. Response of Lichen Planopilaris to Pioglitazone Hydrochloride. *J Drugs Dermatol*. 2019;18(12):1276-9.
100. Ekelem C, Pham C, Mesinkovska NA. A systematic review of the outcome of hair transplantation in primary scarring alopecia. *Ski Appendage Disord*. 2019;5(2):65-71.

101. Lee JA, et al. Hair transplantation in frontal fibrosing alopecia and lichen planopilaris: a systematic review. *Laryngoscope*. 2020;131(1):59-66.
102. Sikora M, et al. The use of naltrexone in dermatology. current evidence and future directions. *Curr Drug Targets*. 2019;20(10):1058-67.
103. Lajevardi V, et al. The efficacy and safety of oral low dose naltrexone versus placebo in the patients with lichen planopilaris: a randomized controlled clinical trial. *J Dermatolog Treat*. 2022;33(2):769-73.
104. Plante J, et al. Tofacitinib in the treatment of lichen planopilaris: a retrospective review. *J Am Acad Dermatol*. 2020;83(5):1487-9.
105. Li Z, et al. Baricitinib as an effective treatment for lichen planopilaris. *Dermatol Ther*. 2022;35(11):e15882.
106. Fonda-Pascual P, et al. Effectiveness of low-level laser therapy in lichen planopilaris. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(5):1020-3.
107. Gerkowicz A, et al. Application of superluminescent diodes (sLED) in the treatment of scarring alopecia - a pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;28:195-200.
108. Jha AK. Platelet-rich plasma as an adjunctive treatment in lichen planopilaris. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(5):e109-e110.
109. Jha AK. Platelet-rich plasma for the treatment of lichen planopilaris. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79(5):e95-e96.
110. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
111. Duan T, et al. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Front Immunol*. 2022;13:812774.
112. Matin N, et al. Therapeutic targeting of Toll-like receptors in cutaneous disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(12):1651-63.
113. Kaur H, Ali SA. Probiotics and gut microbiota: mechanistic insights into gut immune homeostasis through TLR pathway regulation. *Food Funct*. 2022;13(14):7423-47.
114. Kumar V. Going, toll-like receptors in skin inflammation and inflammatory diseases. *EXCLI J*. 2021;20:52-79.
115. Sun L, Liu W, Zhang LJ. The role of Toll-like receptors in skin host defense, psoriasis, and atopic dermatitis. *J Immunol Res*. 2019;2019:1824624.

116. Salem SAM, Abu-Zeid RM, Nada OH. Immunohistochemical study of toll-like receptors 1 and 2 expression in cutaneous lichen planus lesions. *Arch Dermatol Res.* 2013;305(2):125-31.
117. Tawdy AE, Rashed L. Downregulation of TLR-7 receptor in hepatic and non-hepatic patients with lichen planus. *Int J Dermatol.* 2012;51(7):785-9.
118. Domingues R, et al. The dysfunctional innate immune response triggered by Toll-like receptor activation is restored by TLR7/TLR8 and TLR9 ligands in cutaneous lichen planus. *Br J Dermatol.* 2015;172(1):48-55.
119. Domingues R, et al. Activation of myeloid dendritic cells, effector cells and regulatory T cells in lichen planus. *J Transl Med.* 2016;14(1):171.
120. Osorio-Osorno YA, et al. Oral lichen planus: a chronic inflammatory model to study the regulation of the Toll-like receptor signaling in oral keratinocytes. *J Oral Biosci.* 2020;62(2):115-22.
121. Ohno S, et al. Enhanced expression of Toll-like receptor 2 in lesional tissues and peripheral blood monocytes of patients with oral lichen planus. 2011;38(4):335-44.
122. Amin NR, Yussif N, Ahmed E. The effect of smoking on clinical presentation and expression of TLR-2 and CD34 in oral lichen planus patients: clinical and immunohistochemical study. *BMC Oral Health.* 2020;20(1):129.
123. Liu J, et al. *Candida albicans* induces TLR2/MYD88/NF- κ B signaling and inflammation in oral lichen planus-derived keratinocytes. *J Infect Dev Ctries.* 2018;12(9):780-6.
124. Zhang M, et al. *E. coli* LPS/TLR4/NF- κ B signaling pathway regulates Th17/Treg balance mediating inflammatory responses in oral lichen planus. *Inflammation.* 2023;46(3):1077-90.
125. Janardhanam SB, et al. Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Arch Oral Biol.* 2012;57(5):495-502.
126. Siponen M, et al. TLR4 and TLR9 are induced in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(10):741-7.
127. Zeng Q, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces over production of CC chemokine ligand 2 via toll-like receptor-4 in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(2):166-72.
128. Sinon SH, et al. Downregulation of toll-like receptor-mediated signalling pathways in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(1):28-34.
129. Wang Y, et al. Increased infiltration of CD11 c+/CD123+ dendritic cell subsets and upregulation of TLR/IFN- α signaling participate in pathogenesis of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(5):459-67.e2.

130. Stanimirovic D, et al. TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 gene polymorphisms associated with oral lichen planus risk. *Eur J Oral Sci.* 2013;121(5):421-6.
131. Zeljic K, et al. Association of TLR2 , TLR3 , TLR4 and CD14 genes polymorphisms with oral cancer risk and survival. *Oral Dis.* 2014;20(4):416-24.
132. Selleri S, et al. Toll-like receptor agonists regulate β -defensin 2 release in hair follicle. *Br J Dermatol.* 2007;156(6):1172-7.
133. Reithmayer K, et al. Human hair follicle epithelium has an antimicrobial defence system that includes the inducible antimicrobial peptide psoriasin (S100A7) and RNase 7. *Br J Dermatol.* 2009;161(1):78-89.
134. Alegre E, et al. Some basic aspects of HLA-G biology. *J Immunol Res.* 2014;2014:657625.
135. Carosella ED, et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol.* 2008;29(3):125-32.
136. Contini P, et al. HLA-G expressing immune cells in immune mediated diseases. *Front Immunol.* 2020;11:1613.
137. Lin A, Yan WH. Heterogeneity of HLA-G expression in cancers: facing the challenges. *Front Immunol.* 2018;9:2164.
138. Onno M, et al. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. *Hum Immunol.* 1994;41(1):79-86.
139. Urosevic M. HLA-G in the skin-Friend or foe? *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):480-4.
140. Ulbrecht M, et al. HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur J Immunol.* 1994;24(1):176-80.
141. Aractingi S, et al. HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol.* 2001;159(1):71-7.
142. Khosrotehrani K, et al. HLA-G expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2001;117(3):750-2.
143. Ibrahim EC, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer.* 2004;108(2):243-50.
144. Ito T, et al. Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. *J Invest Dermatol.* 2005;125(6):1139-48.

145. Yari F, et al. Expression of HLA-G in the skin of patients with pemphigus vulgaris. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2008;7(1):7-12.
146. Wastowski IJ, et al. HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009;36(6):1230-4.
147. Cardili RN, et al. Expression of human leucocyte antigen-G primarily targets affected skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2010;163(4):769-75.
148. Gazit E, et al. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol.* 2004;65(1):39-46.
149. Rosado S, et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2008;69(1):9-15.
150. Jeong KH, et al. Association between an HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism and non-segmental vitiligo in the Korean population. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(6):577-82.
151. Paus R, et al. Expression of classical and non-classical MHC class I antigens in murine hair follicles. *Br J Dermatol.* 1994;131(2):177-83.
152. Breitkopf T, et al. Somatostatin expression in human hair follicles and its potential role in immune privilege. *J Invest Dermatol.* 2013;133(7):1722-30.
153. Deonizio JMD. *Micose fungóide foliculotrópica: descrição clínico-epidemiológica, análise histológica e investigação do colapso do imunoprivilégio do folículo piloso [tese].* São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2015.
154. Deonizio JMD, et al. Immune privilege disruption in folliculotropic mycosis fungoides: investigation of major histocompatibility complex antigen expression. *Int J Dermatol.* 2018;57(6):675-80.
155. Kruglikov IL, Scherer PE. Caveolin as a universal target in dermatology. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):80.
156. Egger AN, et al. The importance of caveolins and caveolae to dermatology: Lessons from the caves and beyond. *Exp Dermatol.* 2020;29(2):136-48.
157. Couet J, et al. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6525-33.
158. Selleri S, et al. Caveolin-1 is expressed on multipotent cells of hair follicles and might be involved in their resistance to chemotherapy. *Br J Dermatol.* 2005;153(3):506-13.
159. Senna MM, et al. Frontiers in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia research: pathobiology progress and translational horizons. *JID Innov.* 2022;2(3):100113.

160. Jozic I, et al. A cell membrane-level approach to cicatricial alopecia management: is caveolin-1 a viable therapeutic target in frontal fibrosing alopecia? *Biomedicines*. 2021;9(5):572.
161. Jiao H, et al. Caveolin-1 Tyr 14 phosphorylation induces interaction with TLR4 in endothelial cells and mediates MyD88-dependent signaling and sepsis-induced lung inflammation. *J Immunol*. 2013;191(12):6191-9.
162. Li X, et al. Caveolin-1 increases proinflammatory chemoattractants and blood-retinal barrier breakdown but decreases leukocyte recruitment in inflammation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(10):6224-34.
163. Lim JS, et al. Direct regulation of TLR5 expression by caveolin-1. *Mol Cells*. 2015;38(12):1111-7.
164. John V, et al. Caveolin-1 controls vesicular TLR2 expression, p38 signaling and T cell suppression in BCG infected murine monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Front Immunol*. 2019;10:2826.
165. Liu J, et al. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats by inhibition of caveolin-1 downstream signaling. *Biomed Pharmacother*. 2019;118:109314.
166. Chiang C, et al. Hydroxychloroquine and lichen planopilaris: efficacy and introduction of Lichen Planopilaris Activity Index scoring system. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(3):387-92.
167. Doche I, et al. "Normal-appearing" scalp areas are also affected in lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia: an observational histopathologic study of 40 patients. *Exp Dermatol*. 2018;29(3):278-81.
168. Elston DM, et al. A comparison of vertical versus transverse sections in the evaluation of alopecia biopsy specimens. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(2):267-72.
169. Özcan D, Özen A, Seçkin D. Vertical vs. transverse sections of scalp biopsy specimens: A pilot study on the comparison of the diagnostic value of two techniques in alopecia. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36(8):855-63.
170. Al-Zaid T, et al. Sebaceous gland loss and inflammation in scarring alopecia: a potential role in pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(3):597-603.
171. Carosella ED, et al. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol*. 2001;22(10):553-5.
172. Liu CH, et al. An optimized melanin depigmentation method for histopathological and immunohistochemical staining of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Surg Pathol*. 2023;(1):1-5.

173. Velasco DP, et al. Analysis of the effects of melanin depigmentation on immunohistochemical staining. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2022;30(8):573-6.
174. Lara H, et al. Quantitative Image analysis for tissue biomarker use: a white paper from the Digital Pathology Association. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021;29(7):479-93.
175. Pivarcsi A, et al. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*. 2003;15(6):721-30.
176. Xiong L, et al. Timely wound healing is dependent on endothelial but not on hair follicle stem cell Toll-like receptor 2 signaling. *J Invest Dermatol*. 2022;142(11):3082-3092.e1.
177. Adase CA, et al. Non-coding double-stranded RNA and antimicrobial peptide LL-37 induce growth factor expression from keratinocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 2016;291(22):11635-46.
178. Nelson AM, et al. dsRNA released by tissue damage activates TLR3 to drive skin regeneration. *Cell Stem Cell*. 2015;17(2):139-51.
179. Wier EM, Garza LA. Through the lens of hair follicle neogenesis, a new focus on mechanisms of skin regeneration after wounding. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;100:122-9.
180. Kim D, et al. Noncoding dsRNA induces retinoic acid synthesis to stimulate hair follicle regeneration via TLR3. *Nat Commun*. 2019;10(1):2811.
181. Constantinou A, et al. Dysbiosis and enhanced beta-defensin production in hair follicles of patients with lichen planopilaris and frontal fibrosing alopecia. *Biomedicines*. 2021;9(3):266.
182. Constantinou A, et al. The potential relevance of the microbiome to hair physiology and regeneration: the emerging role of metagenomics. *Biomedicines*. 2021;9(3):236.
183. Sivanantham A, et al. Caveolin-1 regulates OMV-induced macrophage pro-inflammatory activation and multiple Toll-like receptors. *Front Immunol*. 2023;14:1044834.
184. Wang XM, et al. The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *J Immunol*. 2009;182(6):3809-18.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Análise da expressão de HLA-G e receptores toll-like 2, 3, 4 e 5 no folículo piloso do couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar

Pesquisador principal – Professora Doutora Valéria Aoki (Inscrição Conselho Regional: nº 60080)

Departamento/Instituto – Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP)

Duração da Pesquisa: 02 anos

Convidamos o(a) Sr.(a) a participar voluntariamente deste estudo sobre uma doença causadora de perda permanente de cabelos chamada líquen plano pilar. Para que você possa tomar uma decisão se quer ou não participar deste estudo, este documento descreve o objetivo do estudo, seus direitos e os possíveis benefícios e riscos de participação. Leia as informações com calma e sinta-se à vontade para decidir se é do seu interesse participar desta pesquisa. Se tiver alguma dúvida, pergunte ao médico do estudo para obter mais esclarecimentos.

Quais são os objetivos do estudo?

O estudo tem como objetivo entender melhor os mecanismos que causam o líquen plano pilar. Assim, o surgimento de novos conhecimentos podem ajudar a esclarecer dúvidas e serão muito importantes para melhorar o tratamento e o seguimento dos pacientes com a doença.

Quais procedimentos serão realizados?

Serão avaliados fragmentos de couro cabeludo coletados através de biópsia após autorização dos pacientes, durante seu acompanhamento habitual no Hospital das Clínicas.

Se você tem líquen plano pilar, serão coletadas duas biópsias: uma na região da perda capilar e outra em uma área de couro cabeludo não afetada.

Se você não tem líquen plano pilar, será coletada uma biópsia no local onde será o corte da cirurgia, que não afetará o aspecto final da sua cicatriz.

As biópsias serão realizadas após injeção de anestesia, retirada de um ou mais fragmentos de pele de 6mm de diâmetro, fechamento do local da cirurgia por pontos com fio de Nylon e cobertura com

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

curativo. O local da biopsia será fotografado para registrar a(s) área(s) do couro cabeludo onde foi(ram) feita(s) a(s) biopsia(s).²

Quais os possíveis riscos e desconfortos decorrentes da participação na pesquisa?

A biopsia de couro cabeludo é considerada um procedimento minimamente invasivo que pode gerar desconforto leve e tratável com analgésicos comuns. O local da biopsia deve ser limpo diariamente com água e xampu ou sabonete para manter o local limpo. Caso haja dor latejante, saída de pus, calor ou vermelhidão no local o participante deve entrar em contato com a Dra. Alessandra Anzai para o tratamento imediato. A biopsia deixa no local uma pequena cicatriz mas que não é comumente visível. Ao participar da pesquisa, o paciente continuará seu seguimento habitual no ambulatório de dermatologia, e seu tratamento não será influenciado pelo estudo.

Quais são os benefícios do estudo?

Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que pretende entender os mecanismos da doença, ainda sem impacto no tratamento. No entanto, o maior conhecimento sobre esta doença pode melhorar a assistência à saúde dos doentes.

Como será o acompanhamento e a assistência durante o estudo? Quais são os direitos dos participantes?

Os pacientes que tem líquen plano pilar continuarão a ser acompanhados de modo habitual no ambulatório da dermatologia e os pacientes sem líquen plano pilar no ambulatório de origem. Todos os participantes do estudo terão acesso aos resultados da biopsia e das conclusões da pesquisa no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

É garantido aos participantes a liberdade de recusar-se ou retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem penalização alguma, de sigilo e privacidade, e sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles. Os pesquisadores comprometem-se a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Os participantes terão o direito de manterem-se atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas.

Há alguma despesa para o participante da pesquisa?

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

Caso aceite participar da pesquisa, em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Prof^ª Dra. Valéria Aoki, que pode ser encontrada no endereço. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia CEP: 05403-000, Telefone (11) 2661-6398, e-mail dermatologia.ichc@hc.fm.usp.br. Também poderá entrar em contato com a pesquisadora Alessandra Anzai no mesmo endereço e telefone. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Análise da expressão de HLA-G e receptores toll-like 2, 3, 4 e 5 no folículo piloso do couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Dra. Valéria Aoki) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (Dra. Alessandra Anzai) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal
Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo
Data / /

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

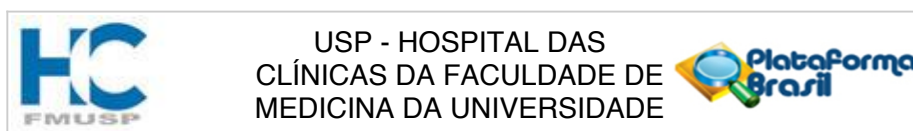
1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

ANEXO B - Carta de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CAPESQ do HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão de HLA-G e receptores toll-like 2, 3, 4 e 5 no folículo piloso do couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar

Pesquisador: Valeria Aoki

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 81997418.2.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.509.708

Apresentação do Projeto:

Avaliação da expressão de receptores Toll-like em biopsias de couro cabeludo de pacientes com líquen plano pilar, comparando com indivíduos normais.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a expressão de TLRs e HLA-G na epiderme e folículo piloso de pacientes portadores de líquen plano pilar, com biopsias na zona afetada e não afetada, e de indivíduos não acometidos pela patologia; correlacionar a expressão imunohistoquímica destes marcadores com a sintomatologia e gravidade do infiltrado inflamatório nas lesões de líquen plano pilar.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes à realização de biopsias cutanêas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não apresenta questionamentos éticos, uma vez que o grupo controle que fornecerá amostra de pele são, será composto por pacientes que serão submetidos à cirurgia neurológica, os quais, após assinatura do TCLE, concordarem em ceder amostra de pele do couro cabeludo

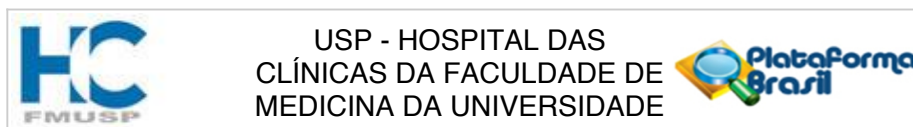
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado à finalidade da pesquisa

Recomendações:

APROVADO.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.509.708

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1041686.pdf	11/01/2018 22:43:54		Aceito
Declaração do Patrocinador	justorcamento.pdf	11/01/2018 22:43:33	Valeria Aoki	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromissodoutorado.pdf	11/01/2018 22:43:13	Valeria Aoki	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	11/01/2018 22:42:18	Valeria Aoki	Aceito
Folha de Rosto	FR_ValeriaAoki.pdf	09/01/2018 18:32:59	Valeria Aoki	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_anzai.doc	11/12/2017 23:42:40	Valeria Aoki	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	11/12/2017 23:42:28	Valeria Aoki	Aceito

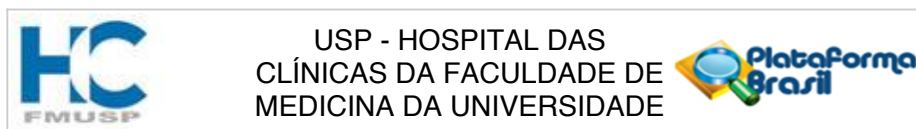
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.509.708

SAO PAULO, 23 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br