

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DA AROMATASE EM FOLÍCULOS PILOSOS DO VÉRTICE
DO ESCALPO DE MULHERES COM CICLOS OVULATÓRIOS E PACIENTES
COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS (PCOS): ANÁLISE DE
ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS HORMONAIS E METABÓLICOS**

POLYANA SARTORI MAIER

Orientadora: Prof^a Dr^a Poli Mara Spritzer

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Débora Martinho Morsch

**Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, UFRGS, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre**

Porto Alegre, março de 2008

AGRADECIMENTOS

Das utopias

***Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las
Que tristes os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas!***

(Mário Quintana)

Aos amigos e colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre:

Andréa Nácul	Fernanda Amarante	Lívia Mastella	Simone Lara
César Vilodre	Fernanda Missio	Mariana Toscani	Simone Matiello
Denusa Wiltgen	Gislaine Casanova	Maria Cristina Matos	Suzana Ruschel

Aos amigos e colegas do Departamento de Fisiologia da UFRGS:

Adriane Pozzobon	Lolita Schneider
Ana Ferrari	Vanderlei Biolchi

À equipe de apoio do nosso grupo de pesquisa:

Idelma Pitan
Míriam Sant'Helena

Aos bolsistas de iniciação científica:

Ramon Bossardi
Thiely Ott

Agradecimentos especiais à minha orientadora, Poli Mara Spritzer: uma pessoa muito correta e sensata, sua inquietude é contagiante para a pesquisa. À Débora Morsch, pela co-orientação nesse estudo, e principalmente pela amizade e carinho durante as dificuldades na bancada. Às colegas de laboratório que se tornaram grandes amigas com a convivência, acompanharam toda a jornada e sempre torceram muito para o sucesso dessa etapa: Sheila Lecke e Simone Radavelli. À Gisele Branchini, pelos momentos que dividimos como colegas e pela grande amizade, há anos consolidada.

Por fim, à minha família. Aos meus pais, Osmar e Ana Mariza, que nunca pouparam esforços para investir na minha educação e formação. À minha irmã Letícia, que será minha cobaia como aluna de Fisiologia. À avó Nair, pelas suas poderosas orações que acalmaram minhas moléculas. E ao Rafael, meu amor, pelo companheirismo e por ser presença constante nas minhas conquistas.

RESUMO

O entendimento dos mecanismos de ação hormonal envolvidos com o crescimento do pêlo são de grande relevância na área médica e podem representar novas perspectivas no tratamento para distúrbios de crescimento de pêlos. A aromatase, enzima que converte androgênios em estrogênios, é uma das enzimas-chave relacionadas com o metabolismo intra-tecidual de hormônios sexuais.

O objetivo desse estudo foi determinar a expressão gênica da enzima aromatase em folículos pilosos do vértice do escalpo de mulheres com ciclos regulares e ovulatórios e em pacientes com PCOS, verificando possíveis associações com variáveis hormonais e metabólicas dessas mulheres. Cinquenta e quatro mulheres no menacme preencheram os critérios de inclusão (23 com PCOS e 31 com ciclos regulares e ovulatórios) e completaram avaliação antropométrica, hormonal e metabólica. Uma sub-amostra de 16 mulheres (11 com ciclos regulares e ovulatórios e 5 com PCOS) foi selecionada para coleta de folículos pilosos através da técnica do arrancamento. A expressão do gene da aromatase foi avaliada por PCR em tempo real, e os resultados foram normalizados em relação ao gene constitutivo β_2 -microglobulina.

A expressão do gene da aromatase foi observada nos folículos pilosos da região do escalpo de mulheres dos dois grupos em estudo. A expressão deste gene foi de intensidade baixa e variável entre as amostras estudadas e não houve diferença estatisticamente significativa da relação dos genes aromatase/ β_2 -microglobulina entre o grupo de mulheres com ciclos regulares [80 (35,31 – 138,25) e o grupo PCOS [52,11 (5,68 – 84,8), $P = 0,157$]. A expressão do gene da aromatase em folículos pilosos do escalpo de mulheres correlacionou-se negativamente e com significância estatística com os níveis séricos de LH ($P = 0,008$, $r = -0,653$) e esta correlação foi independente de testosterona ou SHBG.

Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que folículos pilosos da região do vértice do escalpo de mulheres expressam o gene da aromatase. A correlação negativa e independente de LH com a expressão gênica da aromatase pode estar refletindo o microambiente hormonal nos folículos pilosos e, em especial, o conjunto das alterações metabólicas e hormonais característico de pacientes com PCOS. É possível que a expressão gênica dessa enzima seja mais evidente na papila dérmica (porção dos folículos pilosos não analisada nesse estudo) e que a regulação do balanço estrogênico no metabolismo local não seja tão pronunciada na porção epitelial dos folículos pilosos que é obtida pela técnica do arrancamento. A análise da expressão protéica da enzima, a seleção de pacientes hirsutas de outras etiologias e de mulheres portadoras de alopecia, e a coleta de outras regiões pilosas hormônio-dependentes estão entre as perspectivas para a confirmação do padrão de expressão gênica da aromatase nos folículos pilosos.

Palavras-chave: metabolismo de hormônios sexuais, folículos pilosos, escalpo, aromatase, Síndrome dos Ovários Policísticos.

ABSTRACT

The knowledge of hormonal mechanisms of action that are involved with hair growth is of great relevance on medical research and could represent new approaches on therapeutics for hair growth disturbs. Aromatase, the enzyme that converts androgens into estrogens, is one of the key enzymes related to sexual hormones metabolism and may act on different target tissues, like the hair follicle.

The aim of this study was to determine the aromatase gene expression on hair follicles from the vertex portion of the scalp of women with regular and ovulatory cycles, and patients with PCOS. We were also interested on the possible association among the gene expression and hormonal/metabolic parameters of these women. Fifty-four women at reproductive age were included (23 with PCOS and 31 with regular and ovulatory cycles), and were submitted to anthropometric, hormonal, and metabolic evaluation. A minor group of 16 women (11 with regular and ovulatory cycles and 5 with PCOS) were selected for hair follicle's molecular analysis, using the plucking technique. Aromatase gene expression was analyzed by using real time PCR, and the results were normalized with the housekeeping gene β_2 -microglobuline.

Aromatase gene expression was observed at the scalp's hair follicles from the two groups of women. The intensity of the gene expression was low and variable among the samples. There was not a statistically significant difference between the women with regular cycles [80 (35,31 – 138,25) and patients with PCOS [52,11 (5,68 – 84,8), $P = 0,157$]. Aromatase gene expression in the plucked hairs from the vertex portion of the scalp of women was negatively correlated with circulating LH levels ($P = 0,008$, $r = -0,653$), and was also independent of testosterone or SHBG levels.

The present results show, for the first time, that plucked hairs from the vertex portion of the scalp of women express the gene of aromatase. The negative and independent correlation between LH and aromatase gene expression may reflect the hormonal microenvironment of the hair follicle, and also the hormonal and metabolic alterations characteristics of women with PCOS. Aromatase gene expression may be more evident at the dermal papilla (not analyzed in this study), and the local metabolism could not be so pronounced on the epithelial portion of hair follicles, when obtained by the plucking method. Aromatase protein expression, plucked hair from other hormone-dependent areas and from women with other clinical conditions like androgenetic alopecia, are some of the perspectives for the confirmation of the pattern of aromatase gene expression on hair follicles.

Key-words: sexual hormones metabolism, hair follicles, scalp, aromatase, Polycystic Ovary Syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfogênese do folículo piloso	11
Figura 2. Anatomia do folículo piloso em fase anágena	12
Figura 3. Metabolismo de esteróides no pêlo	18
Figura 4. Representação esquemática do gene CYP19 em humanos	20
Figura 5. Curvas de dissociação dos genes utilizados no estudo	31
Figura 6. Curva de diluição seriada para quantificação relativa do gene da β_2m ..	32
Figura 7. Parâmetros metabólicos de pacientes com PCOS e mulheres com ciclos regulares	36
Figura 8. Parâmetros hormonais de pacientes com PCOS e mulheres com ciclos regulares	37
Figura 9. Níveis séricos de LH e relação LH/FSH entre os grupos estudados	38
Figura 10. Expressão gênica da aromatase na subamostra de pacientes com PCOS e mulheres com ciclos regulares	39
Figura 11. Correlação entre a expressão da aromatase em folículos pilosos do vértice do escalpo e níveis séricos de LH	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR em tempo real	32
Tabela 2. Condições para reações de amplificação em tempo real	33
Tabela 3. Dados clínicos e antropométricos das participantes do estudo	35
Tabela 4. Dados metabólicos e hormonais das pacientes com PCOS e das mulheres com ciclos regulares	36
Tabela 5. Correlações de Pearson entre o log da relação aromatase/ β_2m e variáveis hormonais e metabólicas	39
Tabela 6. Correlações parciais do log da relação aromatase/ β_2m X log LH, controladas pelos níveis de testosterona total e SHBG	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- 17 β -HSD – 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase
3 α -HSD – 3 α -hidroxiesteróide desidrogenase
3 β -HSD – 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
5 α -R – 5 α -redutase
 β_2 m – β_2 -microglobulina
BMP – proteína morfogênica óssea
BRE – bainha radicular externa
BRI – bainha radicular interna
C/Q – relação cintura/quadril
cDNA – fita de DNA complementar
DHEA – dehidroepiandrosterona
DHEAS – sulfato de dehidroepiandrosterona
DHT – dihidrotestosterona
ECLIA – ensaio eletroquimioluminométrico
FGF – fator de crescimento de fibroblastos
FSH – hormônio folículo-estimulante
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
IAL – índice de androgênios livres
IMC – índice de massa corporal
LH – hormônio luteinizante
PCOS – Síndrome dos Ovários Policísticos
PD – papila dérmica
SHBG – globulina carreadora de hormônios sexuais
SHH – proteína *Sonic Hedgehog*
TGF- β 2 - Fator de crescimento de transformação tipo β 2
TT – testosterona total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	O pêlo	9
1.1.2	Morfogênese e anatomia do folículo piloso	10
1.1.3	Ciclo de crescimento do pêlo	14
1.1.4	Ações e metabolismo de esteróides no folículo piloso	16
1.2	Aromatase	19
1.3	Síndrome dos Ovários Policísticos	22
1.4	Estudos anteriores	24
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Pacientes	27
4.2	Avaliação clínica e laboratorial	27
4.3	Avaliação molecular	29
4.4	Análise estatística	33
4.5	Considerações éticas	34
5	RESULTADOS	35
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 O pêlo

Os pêlos provavelmente surgiram de estruturas sensoriais especializadas com função mecanorreceptora e que evolutivamente facilitaram a função termorregulatória dos sinapsídeos (mamíferos ancestrais semelhantes a répteis), no período Permiano. Mutações subseqüentes transformaram esses “proto-pêlos” numa “proto-pelagem”, conferindo vantagens evolutivas quanto à abrasão e perda hídrica sofrida por esses animais (Maderson, 1972; 2003). Após esses eventos, já no período Jurássico, a endotermia surgiu gradualmente em mamíferos ancestrais, propiciando que a “proto-pelagem” (constituída principalmente de trico-hialina) formasse “pêlos verdadeiros” (Resing e Dale, 1991).

A pele e os pêlos exercem funções críticas para a sobrevivência dos animais. Entre elas podemos citar a proteção contra perda hídrica, variações de temperatura, radiação, traumas, infecções e percepção do ambiente através do tato. Por meio da camuflagem, pele e pêlos promovem proteção contra predadores, além de permitirem maior interação social em épocas de acasalamento (Blanpain e Fuchs, 2006).

As funções dos pêlos na espécie humana não estão totalmente compreendidas, porém acredita-se que estejam envolvidas com a proteção e a comunicação. Cílios e sobrancelhas, por exemplo, impedem a entrada de partículas nos olhos. Além disso, o cabelo provavelmente protege a cabeça e o pescoço dos efeitos do sol e do frio (Randall, 2007). Questões culturais e sociais tornam os pêlos alvo de investigações principalmente na área cosmética. Já na área clínica, desordens no crescimento dos pêlos (queda ou crescimento excessivo) despertam o interesse para estudos relacionados a mecanismos de ação e sensibilidade dos pêlos a hormônios sexuais, visto que nessas situações esses padrões podem estar alterados (Oliveira, 2002). Estima-se que cada pessoa possua 5 milhões de folículos pilosos, sendo que de 80.000 a 150.000 estariam localizados no escalpo (Krause e Foitzik, 2006).

Para que um novo pêlo seja produzido, estruturas denominadas folículos pilosos passam por ciclos de rápido crescimento (fase anágena), regressão (fase catágena) e períodos de repouso (fase telógena), como será descrito a seguir. Em mamíferos, esse é o único tipo de órgão capaz de regenerar-se dessa maneira. Essas transformações são controladas por mudanças nos padrões de expressão/atividade de citocinas, hormônios, neurotransmissores, receptores, fatores de transcrição e enzimas da sinalização do próprio folículo piloso, sendo reconhecidos como mediadores-chave nesse ciclo de crescimento (Krause e Foitzik, 2006).

1.1.2 Morfogênese e anatomia do folículo piloso

O desenvolvimento do folículo piloso, durante a embriogênese, envolve uma série de interações epiteliais e mesenquimais. Após a gastrulação, células do neuroectoderma permanecem na superfície do embrião, dando origem à epiderme. Esse estrato apresenta-se na forma de uma camada simples de células, onde se encontram células epiteliais multipotentes (Blanpain e Fuchs, 2006; Fuchs, 2007).

A indução da formação de cada folículo depende de eventos complexos de comunicação bidirecional entre a epiderme e a mesênquima subjacente (Paus *et al.*, 1999). Durante o desenvolvimento embrionário, algumas células indiferenciadas da epiderme são instruídas pelo que se conhece como “primeiro sinal dérmico” (figura 1) Esse sinal, proveniente da derme subjacente, induz a primeira mudança morfológica notável no desenvolvimento do folículo piloso: a formação da *placode*. Com isso, células do epitélio basal tornam-se alongadas e invaginam em alguns pontos em direção à derme, circundando a região que dará origem posteriormente à papila dérmica (Blanpain e Fuchs, 2006; Hardy, 1992). Essa sinalização dérmica provavelmente é uniforme em todas as regiões do corpo, e não localizada periodicamente, sendo que o que define as diferenças de tamanho e distribuição dos pêlos nessas regiões é um balanço dos níveis de ativação de promotores e repressores do próprio folículo piloso. Provavelmente o primeiro sinal dérmico origina-se de vias de sinalização da proteína Wnt, que resulta no acúmulo de β -catenina no núcleo das células da *placode* (Millar, 2002).

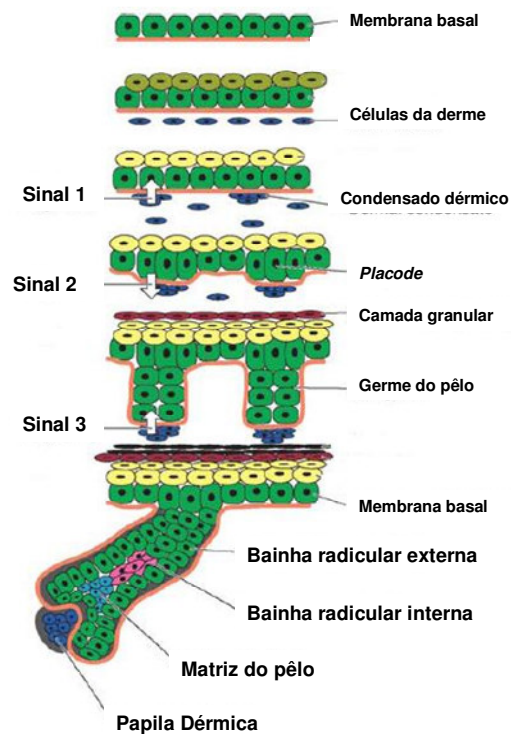


Figura 1. Morfogênese do folículo piloso ((Blanpain e Fuchs, 2006).

Em resposta ao primeiro sinal dérmico, a epiderme emite o que se denomina de “sinal epitelial”, induzindo a diferenciação de células da derme em constituintes da papila dérmica do folículo piloso. A sinalização Wnt também está envolvida nesse processo, além de fatores de crescimento produzidos pela *placode* (Blanpain e Fuchs, 2006; Millar, 2002).

Outra proteína secretada pela *placode* é a *Sonic hedgehog* (SHH). Análises de camundongos sem SHH indicam que a proteína não é um componente para o surgimento do sinal epitelial, mas é necessária para regulação da proliferação e crescimento da papila dérmica (Millar, 2002). Assim, a sinalização SHH está mais amplamente envolvida no “segundo sinal dérmico”. Através desse processo, a papila dérmica recém formada tem influência sob a porção epitelial do folículo ainda em desenvolvimento, estimulando seu crescimento e diferenciação celular (Blanpain e Fuchs, 2006). Outras moléculas sinalizadoras contribuem para a formação do folículo piloso: fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e o fator de crescimento de transformação tipo $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) induzem a diferenciação, enquanto

membros da família da proteína morfogênica óssea (BMP) parecem ser inibidores desses eventos (Millar, 2002).

A papila dérmica (PD), órgão formado a partir da porção dérmica do folículo piloso, consiste de um pequeno agrupamento de células mesenquimais densamente reunidas numa estrutura morfológicamente semelhante a uma cebola (Blanpain e Fuchs, 2006; Krause e Foitzik, 2006). Algumas vezes denominada de “papila folicular”, a PD é o centro mesenquimal de comando do folículo piloso. O tamanho do bulbo do pêlo, a provável duração da fase de crescimento e, conseqüentemente, o diâmetro e o comprimento da haste são diretamente ditados pelo volume de células existentes na papila dérmica. Assim, quanto maior a PD, maior o seu poder de secretar fatores que conseqüentemente determinarão as características do pêlo (Jahoda e Reynolds, 1996; Paus e Foitzik, 2004).

Os compartimentos de origem epitelial do folículo piloso consistem de pelo menos 8 cilindros concêntricos: bainha radicular externa (BRE) e camada guia da BRE; camada de Henle, camada de Huxley e cutícula da bainha radicular interna (BRI); córtex, cutícula e medula da haste do pêlo (figura 2) (Paus e Foitzik, 2004).

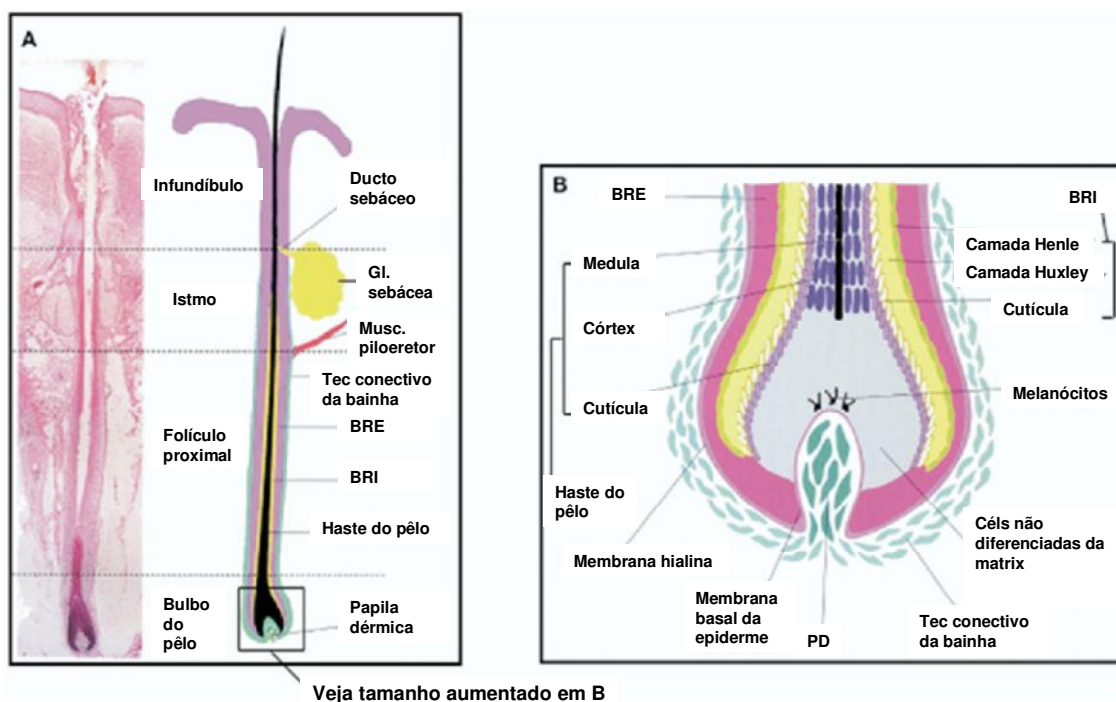


Figura 2. Anatomia do folículo piloso em fase anágena. A) À esquerda, secção histológica longitudinal. À direita, representação esquemática das estruturas. B) Estrutura detalhada do bulbo do pêlo (Krause e Foitzik, 2006).

A BRE e a BRI atuam no propósito de guiar a haste no sentido correto, até que o pêlo possa emergir na superfície da pele (Stenn e Paus, 2001). A BRE é a camada externa contínua com a epiderme que mantém contato com a membrana basal. Já a BRI é o “envelope” da futura haste, ou seja, o canal interno da haste do pêlo que se degenera próximo à pele, permitindo que o pêlo atinja a superfície (Blanpain e Fuchs, 2006). Ambas as estruturas são separadas pela camada-guia, cuja função na dinâmica do folículo piloso permanece incerta (Rogers, 2004).

Na base do folículo maduro (porção denominada bulbo do pêlo), envolvendo a PD e separada por uma membrana basal, existe um grupo de células altamente proliferativas, denominadas conjuntamente de queratinócitos, ou células da matriz do pêlo. Provavelmente, essas células são as que apresentam as mais altas taxas de mitose encontradas no corpo humano (Krause e Foitzik, 2006). A matriz divide-se para formar anéis concêntricos de células diferenciadas que originam a haste do pêlo (tricócitos), bem como a membrana que a envolve (bainha radicular interna) (Blanpain e Fuchs, 2006).

Como no período pós-natal a formação de novos folículos pilosos já não é mais possível, a porção inferior do órgão regenera-se a fim de produzir um novo pêlo. Com esse propósito, e para manutenção da epiderme, células-tronco epiteliais multipotentes sofrem divisão mitótica durante o desenvolvimento do pêlo (Alonso e Fuchs, 2006). Essas células, denominadas células *bulge*, residem na região protuberante do folículo piloso que não degenera durante o ciclo de crescimento do pêlo, abaixo da glândula sebácea. O ciclo celular é lento e permanecem quiescentes até o recebimento de sinais para que proliferem e se diferenciem, originando componentes do pêlo num novo ciclo de crescimento (Alonso e Rosenfield, 2003; Blanpain e Fuchs, 2006; Ohnemus *et al.*, 2006). Várias evidências sugerem que há um fluxo contínuo de células *bulge* durante o estágio de crescimento do pêlo. As células multipotentes podem ascender para a epiderme interfolicular ou descender para diferenciar-se em células da BRE ou queratinócitos da matriz (Blanpain e Fuchs, 2006; Krause e Foitzik, 2006; Panteleyev *et al.*, 2001).

1.1.3 Ciclo de crescimento do pêlo

O ciclo de crescimento dos pêlos provavelmente surgiu da necessidade de regenerar a haste do pêlo quando esta havia sido perdida, como resultado de danos sofridos devido a pressões ambientais (Stenn e Paus, 1999). A razão da existência desse ciclo não é óbvia, mas podem ser incluídos alguns motivos como: a limpeza da superfície da pele para prevenção da atividade de parasitas; a excreção de compostos químicos que estariam encapsulados nos tricócitos. Além disso, o ciclo pode ser um regulador das secreções parácrinas e também endócrinas de hormônios e moduladores de crescimento produzidos no folículo piloso, que posteriormente são liberados na pele ou circulação. Finalmente, o fenômeno pode atuar como um sistema protetor dos queratinócitos em divisão contra os danos oxidativos sofridos pelas altas taxas de divisão celular (Paus e Foitzik, 2004; Stenn e Paus, 2001).

Em humanos, cada folículo piloso possui seu ritmo inerente, portanto os ciclos não são sincronizados. Apesar disso, pequenos grupos de folículos pilosos do escalpo de humanos podem organizar-se em unidades foliculares, onde aproximadamente 3 folículos comportam-se como unidades funcionais. Já na maioria dos roedores, muitos folículos pilosos ciclam simultaneamente, e o crescimento ocorre sincronizadamente (Stenn e Paus, 2001).

A fase de crescimento do pêlo (anágena) é subdividida em 6 estágios, definidos por critérios morfológicos. Nessa fase, reguladores-chave do desenvolvimento do folículo piloso como membros da sinalização Wnt, família BMP e TGF β , proteína SHH e neurotrofinas são novamente recrutados (Millar, 2002). É nessa fase que as células epiteliais diferenciam-se para originar as linhagens celulares concêntricas que formarão o pêlo. Estima-se que a duração de cada ciclo celular dos queratinócitos seja de aproximadamente 18 horas. A pigmentação do pêlo também está associada a essa fase do ciclo, ocorrendo somente durante esse período. A duração de um pêlo é definida pela duração da fase anágena, que varia de 2 a 6 anos no escalpo de humanos. Dos folículos existentes no escalpo, cerca de 85 a 90% encontram-se nesse estágio de crescimento ativo (Alonso e Fuchs, 2006; Krause e Foitzik, 2006).

Quando o suprimento de células da matriz do pêlo declina, há uma desaceleração na diferenciação da haste e da BRI. Assim, o folículo entra numa fase de involução e apoptose, que se prolonga por algumas semanas. Esse processo, denominado de fase catágena, é subdividido em 8 diferentes estágios (Alonso e Fuchs, 2006; Krause e Foitzik, 2006). O primeiro sinal da indução catágena é a suspensão da produção de melanina pelo bulbo piloso (Krause e Foitzik, 2006). As células da matriz e da BRE sofrem apoptose. A papila dérmica torna-se condensada e move-se em direção ao terço superior do folículo, repousando um pouco abaixo das células multipotentes. A expressão do supressor apoptótico bcl-2 nessas células garante sua sobrevivência durante o período de involução (Krause e Foitzik, 2006; Lindner *et al.*, 1997). Além da porção inferior do folículo, o epitélio proximal também sofre involução, formando uma estrutura semelhante a uma bolsa. Essa estrutura contém o pêlo *club*, que é despigmentado e é originado a partir de queratinócitos que estavam terminando a diferenciação no fim da fase anágena. É importante ressaltar que, após o período de morfogênese, o ciclo de crescimento do pêlo inicia com essa fase de involução, e não com a fase de crescimento ativo (Paus e Foitzik, 2004).

A regulação da fase catágena deve ser bastante rigorosa, para que o folículo possa ser regenerado no próximo ciclo. Além da proteína p53, o produto do gene *hairless* (Hr) é de fundamental importância, já que atua como repressor negativo da transcrição. Dessa forma, garante que a apoptose ocorra nos compartimentos corretos e que a papila dérmica permaneça intacta (Panteleyev *et al.*, 2000).

Após a regressão, o folículo piloso entra na fase de repouso (telógena), cuja duração varia de 2 a 4 meses no escalpo de humanos. O estágio é de relativa quiescência, onde o folículo aguarda sinais intra e extrafoliculares para intensa proliferação e atividade bioquímica (Krause e Foitzik, 2006). O novo pêlo forma-se adjacente ao pêlo *club*, o qual será expulso (fenômeno conhecido como fase exógena), surgindo no mesmo orifício que o pêlo antigo (Alonso e Fuchs, 2006).

Assim, o processo segue até que sua capacidade seja exaurida. Isso pode ocorrer devido a danos irreparáveis na região de células multipotentes epiteliais, ocasionados por inflamação auto-agressiva dessas células, ou por radioterapia. Dessa forma, esses folículos são impossibilitados de regeneração (Paus e Foitzik, 2004). Diferentemente, a “deleção programada” de folículos parece ser um

fenômeno fisiológico, manifestando-se principalmente com a idade (Paus e Foitzik, 2004).

O ciclo de crescimento do pêlo está associado com mudanças no suprimento sangüíneo. Em espécies com ciclos de crescimento sincronizados, como a maioria dos roedores, o desenvolvimento da fase anágena é acompanhado por um aumento na perfusão cutânea devido a rearranjos vasculares (Mecklenburg *et al.*, 2000; Ohnemus *et al.*, 2006). Entretanto, experimentos com transplante e cultura de folículos pilosos demonstraram que a inervação funcional e o suprimento sangüíneo original não são necessários para que o pêlo cresça, sugerindo que o sistema básico de controle do ciclo de crescimento encontra-se no próprio folículo piloso, mais precisamente na papila dérmica (Ebling, 1988; Stenn e Paus, 2001).

1.1.4 Ações e metabolismo de esteróides no folículo piloso

Hormônios sexuais são sintetizados a partir do colesterol, e podem ser facilmente distinguidos pelo número de carbonos que apresentam em sua cadeia: os estrogênios possuem 18, os androgênios contêm 19 e os progestogênios apresentam 21 carbonos (Chen *et al.*, 2002). Não compete à pele a síntese de hormônios diretamente a partir do colesterol. Porém, esse tecido periférico possui todas as enzimas necessárias para a conversão de pró-hormônios em compostos com maior atividade biológica (Deplewski e Rosenfield, 2000). A produção hormonal periférica é muito significativa: estima-se que cerca de 50% da testosterona circulante seja produzida pela pele e outros órgãos periféricos; e que a produção de estrogênio derivada de “órgãos não-clássicos” seja de 75% em mulheres no período fértil (Orfanos *et al.*, 2000; Zouboulis, 2000). A síntese local de hormônios sexuais evidencia o controle autônomo da pele, que é então capaz de ajustar a formação e o metabolismo de esteróides de acordo com as necessidades locais (Labrie *et al.*, 2000; Zouboulis, 2000).

Androgênios são pré-requisitos para o desenvolvimento de pêlos e glândulas sebáceas. A importância desses hormônios no crescimento do pêlo em humanos foi primeiramente estabelecida por Hamilton e colaboradores, em 1950 (Hamilton, 1950), com observações de que a castração antes da puberdade impedia o

desenvolvimento de barba e pêlos na axila, enquanto que a castração após esse período diminuía a quantidade de pêlos nessas áreas. Além disso, pacientes com insensibilidade aos androgênios não apresentam pêlos pubianos e axilares. Desde então, tem-se comprovado que androgênios aumentam o tamanho do folículo piloso das diferentes regiões corporais, o diâmetro do pêlo e a proporção de tempo que os pêlos permanecem na fase anágena (revisado em Deplewski e Rosenfield, 2000). Uma exceção ocorre nos folículos pilosos do vértice do escalpo, como será detalhado mais adiante.

Apenas uma pequena fração de androgênios é encontrada de forma livre na circulação, existindo um equilíbrio entre a porção livre e o hormônio ligado a proteínas. Aproximadamente 90% da testosterona está ligada a essas proteínas séricas, sendo que a globulina carreadora de hormônios sexuais (SHBG) é a principal proteína de ligação a androgênios e atua como um sistema tampão, limitando a disponibilidade dos esteróides (Hoffmann, 2001).

Os androgênios iniciam a estimulação do crescimento dos pêlos na puberdade, onde se verifica o desenvolvimento de pêlos pubianos e axilares, tanto em meninos como em meninas (Reynolds, 1951). Esses hormônios influenciam folículos pilosos produtores de pêlos do tipo *vellus* (finos, praticamente despigmentados) a se transformarem em pêlos terminais (maiores, mais grossos e pigmentados) (Randall, 2007).

Embora os androgênios influenciem o crescimento de pêlos em muitas áreas (como face, abdômen e peito nos homens), esses hormônios podem ter efeitos opostos em áreas específicas do escalpo, causando calvície. Esse fenômeno envolve uma transformação reversa da descrita anteriormente: pêlos terminais assumem a forma de pêlos do tipo *vellus*. Folículos pilosos de áreas distintas podem então responder de maneira completamente diferente ao mesmo tipo de hormônio circulante, constituindo o que se conhece como um efeito biológico paradoxal. Esses contrastes provavelmente ocorrem por diferenças na expressão gênica individual dos folículos pilosos, com origem na embriogênese (Randall, 2007; Randall *et al.*, 2000).

A síntese hormonal na pele e no folículo piloso ocorre a partir de um pró-hormônio, o sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), precursor de fraca atividade biológica e grande representatividade na circulação, produzido pelas gônadas e adrenais. A conversão de DHEAS em dehidroepiandrosterona (DHEA)

ocorre por ação da esteróide-sulfatase, enzima presente principalmente na papila dérmica dos folículos pilosos, cuja função é a hidrólise 3-hidroxi-esteróides sulfatados em 3-hidroxi-esteróides livres e ativos (figura 3) (Chen *et al.*, 2002).

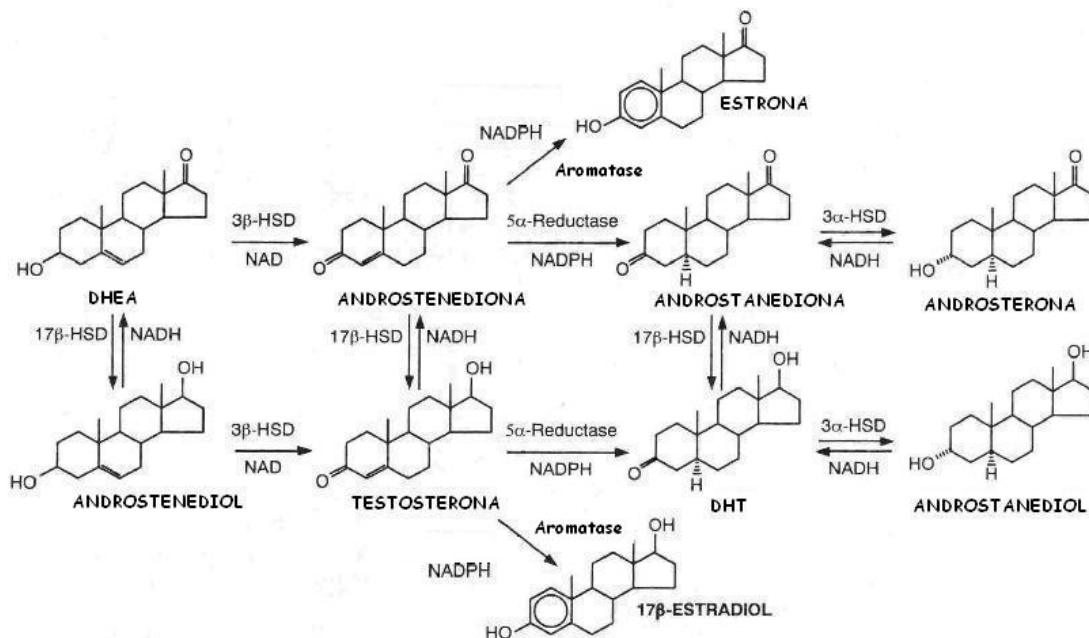


Figura 3. Metabolismo de esteróides no folículo piloso.

O próximo passo é crucial para a biossíntese de esteróides sexuais, e envolve a transformação de DHEA. Por meio da enzima 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (3β-HSD), DHEA é convertida em androstenediona. Através da enzima 17β-hidroxiesteróide desidrogenase (17β-HSD), DHEA pode também dar origem ao androstenediol, que por sua vez pode ser convertido a testosterona (por meio da 3β-HSD).

A ação da 17β-HSD é vista como passo-chave na formação de androgênios e estrogênios. Isso porque a ação redutora da enzima é essencial para a formação de androgênios mais ativos (formação de testosterona e dihidrotestosterona a partir de androstenediona e androstanediona, respectivamente); enquanto que a atividade oxidativa inativa os esteróides sexuais mais potentes.

A testosterona pode também ser convertida a dihidrotestosterona (DHT), por meio da 5α-redutase (5α-R). Dessa forma, ocorre amplificação do sinal androgênico, por duas razões: 1) DHT, diferentemente da testosterona, não pode ser convertida a estrogênios, permanecendo com efeito puramente androgênico; 2) Estudos *in vitro*

de Anderson e Liao, em 1968 (Anderson e Liao, 1968), verificaram que DHT se liga ao receptor de androgênios com maior afinidade que a testosterona, formando um complexo com maior estabilidade.

A regulação dos níveis de hormônios esteróides pode ser realizada pela 3 α -hidroxiesteróide desidrogenase (3 α -HSD), já que sua função é a transformação de DHT em androstanediol. Por fim, a aromatase forma estrogênios a partir de androgênios, catalisando as reações de síntese de 17 β -estradiol e estrona a partir de testosterona e androstenediona, respectivamente.

1.2 Aromatase

A biossíntese de estrogênio é catalisada por uma enzima da superfamília citocromo P450, denominada aromatase citocromo P450 (P450arom ou ARO). A superfamília é extremamente grande, contendo cerca de 480 membros distribuídos em 74 famílias, sendo que o gene da aromatase é o único membro da família 19 (Simpson *et al.*, 2002).

A aromatase, produto do gene CYP19 em humanos, é responsável pelas 3 reações consecutivas de hidroxilação que convertem compostos de 19 carbonos (androgênios) em metabólitos de 18 carbonos (estrogênios) (Chen *et al.*, 2002). O gene CYP19 em humanos foi descrito há alguns anos (Harada *et al.*, 1990; Means *et al.*, 1989; Toda *et al.*, 1990); está localizado no cromossomo 15 e é composto por 34 kb correspondendo à região codificadora (éxons II a X) e 96 kb (éxon I) representando a porção regulatória. Essa região regulatória de tamanho incomum contém 10 promotores tecido-específicos que são utilizados alternativamente em vários tipos celulares (figura 4). Apesar de cada tecido expressar um único éxon I não-traduzido, a região codificadora e traduzível da aromatase inicia no éxon II, permitindo que a proteína seja idêntica em todas as células em que é codificada (Bulun *et al.*, 2003; Mendelson *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2002).

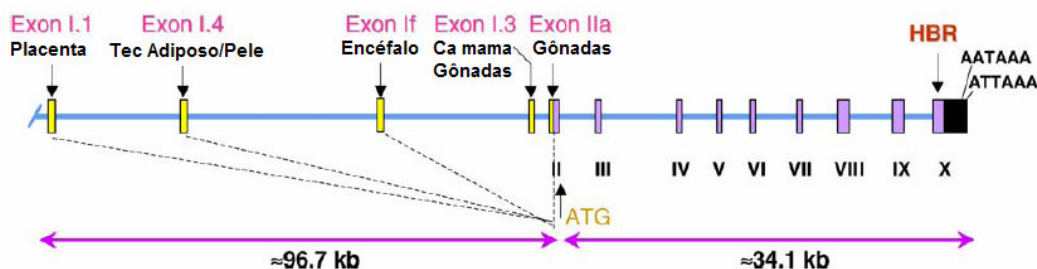


Figura 4. Representação esquemática do gene CYP19 em humanos. Apenas alguns promotores do éxon I estão representados (Mendelson *et al.*, 2005).

O promotor específico para a placenta (I.1) é o mais distalmente localizado em relação ao éxon II (aproximadamente 93 kb). Promotores mais próximos, localizados a cerca de 1 kb do códon de iniciação são os expressos no osso (promotor I.6), câncer de mama (promotor I.3) e gônadas (promotor IIa). Já a porção não-traduzida da proteína expressa na pele consiste da região codificada pelo promotor I.4, localizada a 73 kb do éxon II. Um dos mecanismos que permite o recrutamento desse grande número de promotores é a natureza indistinta do códon ATG de iniciação do éxon II. (Bulun *et al.*, 2003). Embora a região codificadora seja a mesma para todos os tecidos, as seqüências transcritas possuem variações na porção 5', indicando que a regulação da expressão gênica da aromatase é diferente nos diversos tecidos que a apresentam (Simpson *et al.*, 2002).

A partir de estudos de Callard e colaboradores, hoje se sabe que a biossíntese de estrogênios ocorre em todos os grupos de vertebrados. Não foram encontradas evidências da produção desse hormônio em animais desprovidos de notocorda (Callard *et al.*, 1978; Kishida e Callard, 2001). Em humanos, vários tecidos têm a capacidade de expressar aromatase: ovários (células da granulosa e corpo lúteo), testículos (células de Sertoli, de Leydig e germinativas), placenta, fígado (somente fetal), tecido adiposo, pele, ossos (condrócitos e osteoblastos), células endoteliais e de músculo liso. Além disso, a biossíntese de estrogênio ocorre em várias regiões do cérebro, incluindo áreas do hipotálamo, sistema límbico e córtex cerebral (Mendelson *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2002).

A deficiência da aromatase em humanos foi registrada em 10 indivíduos (8 mulheres e 2 homens), ocasionada por mutações de substituição ou criação de um códon de parada prematuro. Meninas recém nascidas apresentaram pseudo-hermafroditismo com clitoromegalia e hipospádia em vários graus de severidade. A

partir da puberdade, as mulheres exibiram amenorréia, falhas no desenvolvimento das mamas, hirsutismo, hipogonadismo-hipergonadotrófico e cistos nos ovários. Meninos sem aromatase apresentaram alta estatura e retardo na idade óssea, resultando em osteopenia e baixa mineralização óssea. Ambos possuíam obesidade razoável do tipo andróide, além de elevados níveis de androgênios circulantes. Entretanto, a infertilidade documentada em um dos indivíduos pode ser devida a outros fatores genéticos (revisado em Simpson *et al.*, 2002).

Folículos pilosos incubados com androstenediona demonstraram a atividade da aromatase em estudos pioneiros de Schweikert e colaboradores (Schweikert *et al.*, 1975). A localização mais precisa da enzima foi determinada por Sawaya e Penneys, onde os pesquisadores constataram por experimentos de imunohistoquímica que a aromatase é expressa principalmente na bainha radicular externa de folículos em fase anágena. Além disso, o estudo não encontrou diferenças quanto à expressão da enzima nos folículos pilosos de homens e mulheres (Sawaya e Penneys, 1992). A localização da aromatase nessa porção epitelial dos folículos pilosos sugere que a enzima tenha funções no metabolismo intrafolicular, convertendo androgênios potentes em estrogênios com o intuito de evitar efeitos danosos em folículos pilosos sensíveis aos androgênios (Hoffmann, 2001).

Courchay e colegas, em estudo posterior com folículos pilosos obtidos pela técnica do arrancamento (contendo principalmente queratinócitos e células da bainha radicular externa), demonstraram por RT-PCR altos níveis de expressão de 17β -HSD2 e 5α R-1. Entretanto, a expressão da aromatase foi bem menos pronunciada nesses folículos, se comparada com outros tecidos utilizados como controles positivos (testículo, ovário, placenta, útero, adrenais) (Courchay *et al.*, 1996). Outros estudos de Sawaya e Price analisaram biópsias de pacientes com alopecia androgenética e verificaram que a expressão da aromatase era bastante evidente em folículos da região occipital e frontal do escalpo. Além disso, esses pesquisadores evidenciaram que mulheres expressavam maiores níveis da enzima do que homens (6 vezes mais em folículos fronto-temporais e 4 vezes mais em folículos occipitais). Houve também a confirmação da presença da aromatase principalmente nas porções epiteliais do folículo (Sawaya e Price, 1997).

Estudos mais recentes de Hoffmann e colaboradores confirmaram pesquisas anteriores, demonstrando que mulheres possuem expressão aumentada da

aromatase em seus folículos pilosos. Para tal, foram realizadas biópsias de folículos da região occipital de indivíduos normais, onde houve incubação com androstenediona suplementada ou não com 17α -estradiol. Por ensaio imunohistoquímico também se demonstrou que a enzima está presente nas bainhas radiculares dos folículos pilosos (Hoffmann *et al.*, 2002).

A síntese de estrogênios e a atividade da aromatase em órgãos como o folículo piloso ocorrem principalmente de modo local e ação parácrina. O estrogênio produzido em tecidos “não-clássicos” pode ser em pequena quantidade, mas a concentração local é de grande magnitude, proporcionando então os efeitos biológicos. Assim, o estudo da aromatase em tais órgãos é de fundamental importância, já que a produção extragonadal de hormônios pode ter funções fisiológicas e patofisiológicas ainda não reconhecidas (Simpson, 2002).

1.3 Síndrome dos Ovários Policísticos

A Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) é a endocrinopatia mais comum em mulheres no menacme, e também a causa mais freqüente de hiperandrogenismo e oligo-anovulação. A PCOS possui apresentação clínica heterogênea, interferindo nas funções metabólicas, reprodutivas e endócrinas das mulheres afetadas. Estima-se que 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva sejam portadoras de PCOS (Balen, 2004; Ehrmann, 2005). Além de sintomas como anovulação crônica, distúrbio menstrual e manifestações do excesso de androgênios, a síndrome está associada com resistência insulínica, obesidade e maior risco para desenvolver diabetes do tipo 2 e dislipidemia (Hart *et al.*, 2004).

O hiperandrogenismo das pacientes é decorrente da produção ovariana exacerbada, e pode ser verificado por características clínicas e/ou dosagens bioquímicas. Clinicamente, o hiperandrogenismo é diagnosticado pela presença de manifestações cutâneas típicas do excesso de androgênios, como hirsutismo, acne ou alopecia. O hirsutismo em mulheres já é classicamente definido como o crescimento de pêlos de acordo com o padrão masculino de distribuição, e é o

sintoma clínico mais freqüente do hiperandrogenismo, presente em aproximadamente 60% das mulheres com PCOS. Através de dosagens bioquímicas, o excesso de androgênios pode ser verificado por medidas séricas de testosterona total e testosterona livre, que representa a fração do hormônio que está biologicamente disponível (Chang *et al.*, 2005; Norman *et al.*, 2007; Vermeulen *et al.*, 1999).

Embora a etiopatogenia de PCOS não esteja totalmente esclarecida, alguns mecanismos fisiopatológicos são reconhecidos, tais como: aumento da pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e conseqüente alteração na secreção das gonadotrofinas; secreção acíclica de androgênios ovarianos e sua conversão periférica em estrogênios; resistência insulínica com hiperinsulinemia compensatória associada à redução de SHBG (Spritzer, 2002). Apesar da anormalidade de geração de pulsos do GnRH ser bem esclarecida em PCOS, não é evidente se o evento ocorre por alterações intrínsecas na geração da pulsatilidade ou se é causado pelos baixos níveis de progesterona resultantes dos ciclos irregulares dessas mulheres (Ehrmann, 2005).

A definição de PCOS mais comumente utilizada é o critério do National Institutes of Health (NIH), de 1990 (Goodarzi e Azziz, 2006). A partir dessa conferência, concluiu-se que as características mais evidentes para diagnóstico de PCOS são: 1) hiperandrogenismo e/ou hiperandrogenemia; 2) anovulação crônica; 3) exclusão de desordens associadas, como hiperprolactinemia, distúrbios de tireóide e hiperplasia adrenal congênita – forma não clássica (Zawadzki e Dunaif, 1992).

Pela sua alta prevalência e por se caracterizar por aumento na produção ovariana de androgênios, a PCOS é um bom modelo clínico para estudos da regulação hormonal do folículo piloso em mulheres.

1.4 Estudos anteriores

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado como modelo a técnica de “arrancamento” de folículos pilosos do escalpo de homens e mulheres. O método permite a análise do microambiente existente nos folículos pilosos, principalmente dos componentes epiteliais do tecido. Apesar das vantagens do método de cultivo celular, sabe-se que muitas células mudam suas propriedades fisiológicas quando mantidas *in vitro*, quando estão isoladas da interação parácrina com outras células. Pela técnica do “arrancamento”, pode-se verificar a expressão de genes nos folículos pilosos de forma bastante semelhante ao que ocorre *in vivo*, e sem a necessidade de biópsias profundas na pele, que são invasivas e dispendiosas. A metodologia é simples, econômica, não-invasiva e de fácil aceitação pelas pacientes (Oliveira, 2002).

Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou uma menor expressão do gene da enzima 17 β -HSD2 em folículos pilosos de mulheres hirsutas em relação aos folículos de mulheres normais e semelhante ao que ocorre nos homens. Este resultado sugere que a 17 β -HSD2 tenha um papel no desenvolvimento do hirsutismo, já que a enzima é responsável pela inativação de esteróides sexuais mais potentes (como a testosterona) por reações de oxidação (Oliveira *et al.*, 2003b). Outras análises de expressão gênica utilizando a enzima 5 α -R confirmaram a presença do isotipo 1 (5 α -R1) no vértice do escalpo de mulheres hirsutas, mas não verificaram diferença significativa com relação aos padrões de expressão de mulheres normais. Assim, supõe-se que a expressão do gene da 5 α -R1 não esteja relacionada às diferenças de crescimento de pêlos observada entre mulheres hirsutas e não-hirsutas (Oliveira *et al.*, 2003a).

2 JUSTIFICATIVA

O folículo piloso é um microambiente versátil e bastante favorável para diversos tipos de estudos, como diferenciação celular e interações entre epitélio e mesênquima. A unidade pilo-sebácea expressa todas as enzimas capazes de gerar tanto androgênios como estrogênios, e comporta-se como uma comunidade organizada de células que emite, recebe e coordena sinais moleculares de outros tecidos. A compreensão da biologia e mecanismos de ação hormonal envolvidos com o crescimento do pêlo tem sido de grande interesse da área médica, principalmente pela perspectiva de se obter novas opções de tratamento para distúrbios de crescimento de pêlos. O estudo de folículos pilosos da região do escalpo utilizando a técnica do “arrancamento”, desenvolvida rotineiramente pelo grupo, é uma alternativa não-invasiva para o entendimento dos padrões de expressão gênica nesse tecido, de uma forma semelhante ao que acontece *in vivo*. Além disso, a região do vértice do escalpo é sensível a androgênios, podendo ser amplamente utilizada para estudos acerca da influência hormonal. Como etapa complementar aos nossos estudos prévios com o metabolismo de androgênios em mulheres e em busca do melhor entendimento das manifestações cutâneas do hiperandrogenismo, esse estudo pretende compreender esses mecanismos avaliando a expressão gênica no folículo piloso com enfoque no metabolismo de estrogênios.

3 OBJETIVOS

- Determinar a expressão gênica da enzima aromatase em folículos pilosos do vértice do escalpo de mulheres em idade reprodutiva, com ciclos regulares e ovulatórios e em pacientes com PCOS e comprovado aumento nos níveis de androgênios circulantes.
- Verificar se existe associação entre a expressão gênica da aromatase com variáveis hormonais e metabólicas dessas mulheres.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

O grupo de estudo foi constituído de 54 mulheres no menacme. Vinte e três foram selecionadas entre as que consultavam por hirsutismo na Unidade de Endocrinologia Ginecológica (UEG), Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) durante o período de janeiro de 2005 a julho de 2007. Todas foram diagnosticadas como portadoras da PCOS, conforme critérios do NIH (Zawadzki e Dunaif, 1992) e de acordo com estudos previamente publicados (Comim e Spritzer, 2004; Spritzer *et al.*, 2000; Spritzer *et al.*, 2001). As demais 31 mulheres convidadas para compor o grupo controle possuíam ciclos menstruais regulares e ovulatórios, e níveis de androgênios normais. As participantes de ambos os grupos não estavam sob influência de tratamentos hormonais há pelos menos 3 meses. Excluiu-se desse estudo pacientes com tumores ovarianos/adrenais, Síndrome de Cushing, hiperprolactinemia, distúrbios da tireóide e hiperplasia adrenal congênita forma não-clássica.

4.2 Avaliação clínica e laboratorial

A avaliação clínica foi realizada pela equipe médica da UEG do HCPA e incluiu a determinação de medidas antropométricas (peso, altura, medida de circunferência da cintura e do quadril) e cálculo do índice de massa corporal (IMC) e relação cintura/quadril (C/Q).

A avaliação hormonal incluiu a determinação de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), DHEAS, testosterona total (TT) e SHBG. Foi estimado o índice de androgênios livres (IAL) através da fórmula:

$$IAL = \frac{TT \text{ (em ng/mL)} \times 4,467 \times 100}{SHBG \text{ (em nmol/L)}}$$

Foram também realizadas dosagens bioquímicas, após jejum noturno de 12 horas: insulina, glicemia, colesterol total, HDL e triglicerídeos. Foram calculados o LDL-colesterol e o índice HOMA por meio das fórmulas:

$$LDL \text{ calculado} = (Colesterol \text{ total} - HDL \text{ colesterol}) - \frac{Triglicerídeos}{5}$$

$$HOMA = \frac{glicose \text{ em jejum (em mg/dL)} \times insulina \text{ em jejum (em mUI/mL)} \times 0,05551}{22,5}$$

Estas dosagens foram executadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme as seguintes especificações:

- Colesterol total, HDL-colesterol, Triglicerídeos e Glicose: determinados por método enzimático colorimétrico – Advia 1650 (Bayer Diagnostics, Mannheim, Alemanha).
- LH: determinado por ensaio eletroquimioluminométrico (ECLIA) – Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Sensibilidade: 0,12 UI/L.
- FSH: determinado por ECLIA – Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Sensibilidade: 0,05 UI/L.
- Insulina: determinado por ECLIA – Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Sensibilidade: 0,200 μ UI/mL.
- Testosterona Total: determinado por radioimunoensaio (RIA). Kit Testosterone RIA DSL-4000 (Diagnostic Systems Laboratories, Texas USA). Sensibilidade: 0,08 ng/mL
- SHBG: determinado por ECLIA – Kit Cobas® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Sensibilidade: 0,35nmol/L
- DHEAS: determinado por ECLIA. Kit reagente Elecsys DHEA-S (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade: 0,10 μ g/dL

4.3 Avaliação molecular

A coleta de folículos pilosos anágenos da região do vértice do escalpo foi feita pelo método do “arrancamento” em uma subamostra das participantes arroladas para o estudo, selecionadas por conveniência. Parte das amostras foi utilizada para as etapas de padronização da expressão do gene da aromatase, conforme descrito adiante, e outra foi utilizada para o estudo propriamente dito e que consistiu de folículos pilosos de 16 mulheres (5 mulheres com PCOS e 11 mulheres com ciclos regulares). Por meio dessa técnica, são selecionadas pequenas mechas de cabelo da região do escalpo com o auxílio de uma pinça hemostática de Crile adaptada. Cada mecha contém cerca de 5 fios de cabelo que são “arrancados” e cujos folículos pilosos são retirados juntamente com a remoção dos fios. Cerca de 4 mechas dessas são coletadas, onde os fios são desprezados e apenas os folículos são acondicionados em placas contendo solução salina fosfato (PBS), para que seja evitada a degradação do material. Após a coleta, os folículos são colocados em tubos tipo *ependorf* e mantidos em nitrogênio líquido até a chegada ao laboratório para o prosseguimento das avaliações.

A avaliação molecular dos folículos pilosos foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Endocrinologia do HCPA, que possuem toda infra-estrutura necessária para os procedimentos. As células dos folículos pilosos foram lisadas com um reagente a base de isotiocianato de guanidina e fenol (Trizol[®], Invitrogen[™], Califórnia, EUA). Com clorofórmio, extraiu-se o RNA total, que foi precipitado por centrifugação a 12000 g a 4°C com álcool isopropílico. O *pellet* resultante de RNA era lavado com etanol 75% e ressuspendido com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A quantificação do RNA foi feita por leitura espectrofotométrica no aparelho GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator (Amersham Biosciences), em absorvância de 260 nm.

A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) das amostras do estudo foi feita a partir de 3 µg do RNA total extraído. Utilizou-se o sistema de pré-amplificação SuperScript[™] First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen[™], Califórnia, EUA) e o termociclador PTC-100[™] Programmable Thermal Controller (MJ Research,

Inc., Watertown, Mass., EUA) para este propósito. Após a desnaturação da fita molde de RNA com oligonucleotídeos iniciadores a 65°C por 5 minutos foi realizada a reação de transcrição reversa na presença de 20 nM de Tris-HCl, 50 nM de KCl, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de uma mistura de dNTPs e 0,1 M de di-tiotreitol (DTT), numa condição de 42°C por 55 minutos. A mistura foi aquecida a 70°C para interrupção da reação e incubada com a enzima Rnase H de *Escherichia coli* por 20 minutos a 37°C, a fim de degradar o RNA não-transcrito.

Após esse procedimento, o cDNA foi purificado com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Inglaterra), de acordo com o protocolo do fabricante, para eliminar possíveis interferentes para a reação de PCR em tempo real.

A análise de expressão gênica foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Endocrinologia do HCPA. Esse estudo utilizou a metodologia de PCR em tempo real, com o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System e o software Sequence Detection Software, versão 1.4, ambos da Applied Biosystems. Nessa técnica, a quantidade de produto formada é monitorada no decorrer da reação, por detecção da fluorescência emitida por corantes ou sondas, que é proporcional à quantidade de produto formado. Assumindo uma determinada eficiência de amplificação, onde tipicamente há duplicação do número de moléculas amplificadas a cada ciclo da reação, é possível calcular o número de moléculas de DNA que estava presente inicialmente em cada amostra (Kubista *et al.*, 2006). O sistema de detecção contínua da fluorescência coleta dados a cada ciclo de amplificação e os dados são analisados na fase exponencial da reação de PCR, onde há alta precisão no processo de amplificação. Quanto maior a quantidade de material presente em uma amostra, menor será o número de ciclos necessário para que o sinal fluorescente seja registrado como estatisticamente significativo acima da fluorescência basal. Esse ponto é definido como ciclo limiar (C_T), e ocorrerá sempre na fase exponencial da reação, onde será realizada a quantificação. Assim, evita-se que a amplificação seja analisada após a reação ter atingido o seu platô, como ocorre com o uso da PCR convencional, onde a quantificação pode não ser tão precisa devido à escassez de um ou mais reagentes nesse estágio da reação (Applied-Biosystems, 2005; Bustin, 2000).

Utilizou-se como sistema de detecção o corante SYBR Green (reagente SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). O sistema é bastante simples

e flexível, já que o corante intercala-se à dupla fita de DNA. Assim, a emissão de luz é proporcional ao número de fragmentos formados na amplificação (Bustin, 2000). Esse sistema permite também realizar um controle de ampliações inespecíficas. Ao final da reação de amplificação, é adicionado um passo de aumento gradual de temperatura, denominado Estágio de Dissociação. À medida que os produtos gerados pela PCR desnaturam com esse aumento da temperatura, o sinal fluorescente do SYBR[®] Green decresce, já que esse emite fluorescência apenas quando o DNA encontra-se em dupla-fita. O gráfico da fluorescência em função da temperatura (denominado curva de dissociação ou curva de *melting*, ilustrado na figura 5) permite verificar a especificidade dos produtos da reação de PCR (Applied-Biosystems, 2005).

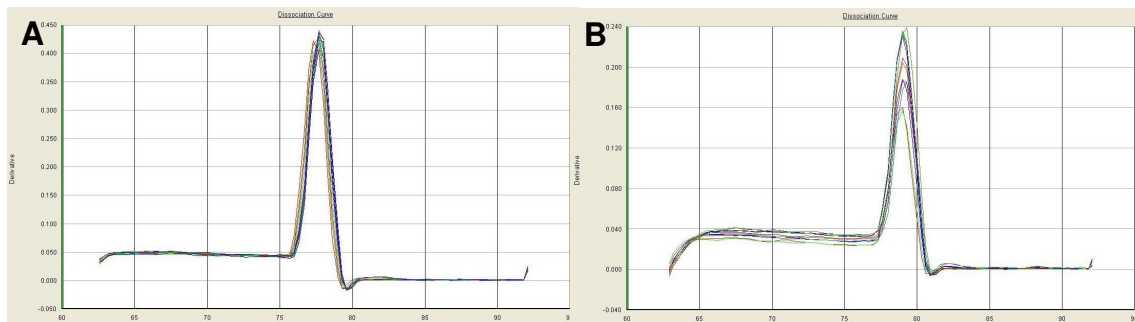


Figura 5. Curvas de dissociação dos genes utilizados no estudo. A) β_2m (temperatura de *melting* = 77,0°C). B) Aromatase (temperatura de *melting* = 79,0°C)

O método escolhido para quantificação foi o de Curva Padrão Relativa. Por essa técnica utilizam-se diluições seriadas (curvas-padrão) para o gene alvo e um controle endógeno em cada reação, e as amostras são interpoladas nessas curvas para quantificação, conforme apresentado na figura 6. O controle endógeno é um gene de referência com expressão homogênea entre as amostras em estudo. Assim, normalizou-se a amplificação do gene alvo com a amplificação do controle endógeno, para correção de variações de amplificação devido à quantidade de material inicial presente nas amostras, condições de processamento e presença de inibidores da PCR (Applied-Biosystems, 2005). O controle endógeno utilizado nesse estudo foi o gene da β_2 -microglobulina (β_2m), e as amostras foram quantificadas em triplicata. Os resultados são, portanto, expressos como a relação aromatase/ β_2m .



Figura 6. Curva de diluição seriada para quantificação relativa do gene da β_2m , utilizado com controle endógeno nesse estudo.

Os oligonucleotídeos iniciadores para as reações (Invitrogen™ California, USA) possuem seqüências de acordo com a tabela 1. Antes de prosseguir para a análise de expressão gênica das pacientes, realizou-se padronizações para as condições da reação de PCR em tempo real visando otimizar os ensaios, como adequação da temperatura de anelamento e quantidade de cDNA e de primers a serem utilizados. As condições das reações de PCR em tempo real estão listadas na tabela 2.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores para as reações de PCR em tempo real.

Gene	Seqüência (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
Aromatase			
<i>sense</i>	TCT GGA TCT CTG GAG AGG AAA	133 pb	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)
<i>antisense</i>	GCC TTT CTC ATG CAT ACC GA		
β_2m			
<i>sense</i>	CTA TCC AGC GTA CTC CAA AG	165 pb	(Primer3Output)
<i>antisense</i>	ACA AGT CTG AAT GCT CCA CT		

Tabela 2. Condições para reações de amplificação em tempo real

	Gene	
	Aromatase	$\beta 2m$
primer sense	200 pmol	200 pmol
primer antisense	500 pmol	200 pmol
SYBR® Green PCR Master Mix	12,5 μ l	12,5 μ l
cDNA	1 μ l	1 μ l
Volume final	25 μ l	25 μ l
Desnaturação	94°C - 30s	-
Anelamento	56°C - 45s	-
Extensão	72°C - 40s	-
Ciclos	40	-

4.4 Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão (variáveis com distribuição normal) ou medianas e intervalo interquartil (variáveis não-paramétricas). Comparações entre as médias foram analisadas pelo Teste t de Student; comparações entre medianas foram analisadas com o Teste Mann-Whitney U. Correlações bivariadas entre variáveis numéricas contínuas foram examinadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson, com transformação logarítmica das variáveis com distribuição não-gaussiana para que se adequassem à utilização desse teste.

Utilizou-se o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, USA), versão 14.0, e foram considerados como significativos os valores de $P < 0,05$. Os gráficos ilustrados na seção dos resultados foram desenhados com auxílio desse mesmo programa, na versão 10.0.

4.5 Considerações éticas

O projeto faz parte de um estudo mais amplo (nº 04-245) aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde (GPPG), reconhecida pela Comissão de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office for Human Research Protection (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board, onde se obteve o consentimento informado por escrito das pacientes e/ou responsáveis.

5 RESULTADOS

A Tabela 3 apresenta os dados clínicos e antropométricos do grupo de mulheres com ciclos ovulatórios e o das pacientes com PCOS participantes desse estudo. Embora ambos os grupos tenham apresentado IMC similar, as pacientes com PCOS eram mais jovens, possuíam uma relação C/Q maior, assim como pressão arterial sistólica e diastólica mais elevadas que as mulheres com ciclos regulares. Além disso, as portadoras de PCOS apresentaram escore clínico de hirsutismo (escore de Ferriman modificado) mais elevado que as pacientes do grupo controle.

Tabela 3. Dados clínicos e antropométricos das mulheres participantes do estudo.

	PCOS <i>n</i> = 23	Ciclos regulares <i>n</i> = 31	<i>P</i>
Idade (anos)	23 ± 7,35	29,7 ± 6,21	0,001
IMC (kg/m ²)	29,93 ± 8,02	27,78 ± 5,48	0,275
Relação C/Q (cm)	0,88 ± 0,06	0,82 ± 0,06	0,004
PA sistólica (mmHg)	127,22 ± 15	115,43 ± 11,02	0,002
PA diastólica (mmHg)	82,09 ± 11,8	72,1 ± 10,29	0,002
Ferriman modificado	15,4 ± 4,71	9,85 ± 5,67	0,002

IMC = índice de massa corporal; C/Q = relação cintura/quadril; PA = pressão arterial
Dados expressos como média ± desvio padrão

Os dados relacionados com as variáveis metabólicas são apresentados na tabela 4 e na figura 7. Em relação aos níveis séricos de glicose, houve diferença apenas na medida de glicose em tempo 120 minutos, onde as mulheres com PCOS apresentaram níveis mais elevados. O perfil lipídico dos dois grupos foi estatisticamente semelhante, exceto em relação ao colesterol HDL, onde as mulheres com ciclos regulares apresentaram níveis mais elevados.

Observou-se também que as mulheres com PCOS apresentaram níveis séricos mais elevados de insulina [12,71 (7,58 – 24,81)] em relação ao grupo controle [8,58 (6,09 – 11,93), *P* = 0,029]. O índice HOMA foi igualmente mais elevado no grupo de pacientes com PCOS do que nas mulheres com ciclos regulares (medianas e intervalos interquartis de 2,85 [1,63 – 5,89] e 1,89 [1,21 – 2,87], respectivamente, *P* = 0,043)

Tabela 4. Dados metabólicos e hormonais das pacientes com PCOS e das mulheres com ciclos regulares.

	PCOS <i>n</i> = 23	Ciclos regulares <i>n</i> = 31	<i>P</i>
Glicose 0' (mg/dL) ^a	91,22 ± 18,99	88,65 ± 8,61	0,507
Glicose 120' (mg/dL) ^a	120,05 ± 60,81	96,9 ± 22,08	0,064
Colesterol total (mg/dL) ^a	157,3 ± 33,02	166,65 ± 28,92	0,274
HDL (mg/dL) ^a	48,43 ± 9,18	55,26 ± 13,27	0,039
LDL calculado (mg/dL) ^a	88,25 ± 27,26	95,77 ± 23,44	0,282
Triglicérides (mg/dL) ^b	73 (57 - 152)	60 (47 - 110)	0,132
DHEAS (µg/dL) ^a	219,57 ± 80,58	179,93 ± 90,21	0,108
FSH (mUI/mL) ^a	5,85 ± 1,72	6,94 ± 3,45	0,132

HDL = lipoproteínas de alta densidade; LDL = lipoproteínas de baixa densidade; DHEAS = sulfato de dehidroepiandrosterona; FSH = hormônio folículo estimulante

a = dados expressos como média ± desvio padrão

b = dados expressos como mediana e intervalo interquartil

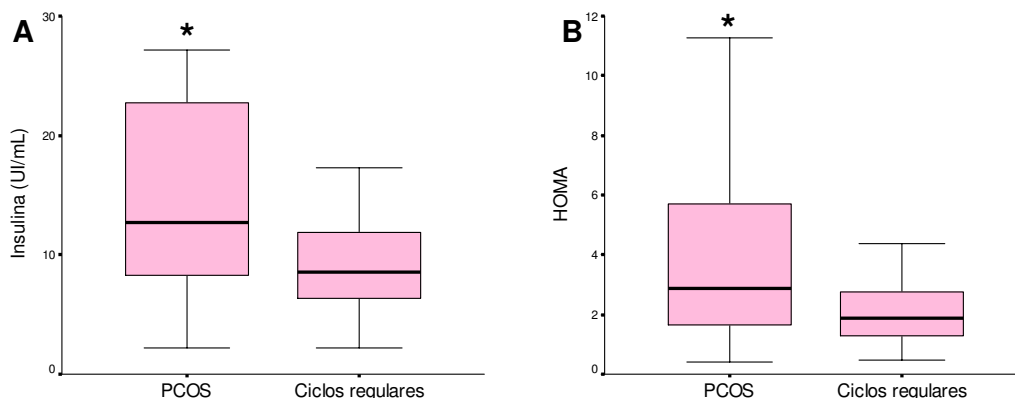


Figura 7. Parâmetros metabólicos de pacientes com PCOS e mulheres com ciclos regulares. A) Níveis séricos de insulina ($P = 0,029$). B) HOMA ($P = 0,043$).

No que se refere às concentrações circulantes dos hormônios estudados, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis séricos de DHEAS e FSH (Tabela 4).

Por outro lado, observou-se que mulheres com PCOS apresentaram níveis séricos mais elevados de testosterona total ($0,99 \pm 0,35$) em relação às pacientes controles ($0,59 \pm 0,18$, $P < 0,001$). Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas também quanto às medidas de SHBG, onde as portadoras de PCOS [23 (17-38,8)] tiveram níveis menores que as mulheres com ciclos regulares [39 (29-51,6) $P = 0,004$] (dados representados na figura 8). Na mesma figura, ilustramos também que as participantes com PCOS apresentaram maior índice de androgênios

livres [14,88 (10,64 – 25,69)] comparadas às participantes do grupo controle [5,74 (4,47 – 9,28) $P < 0,001$].

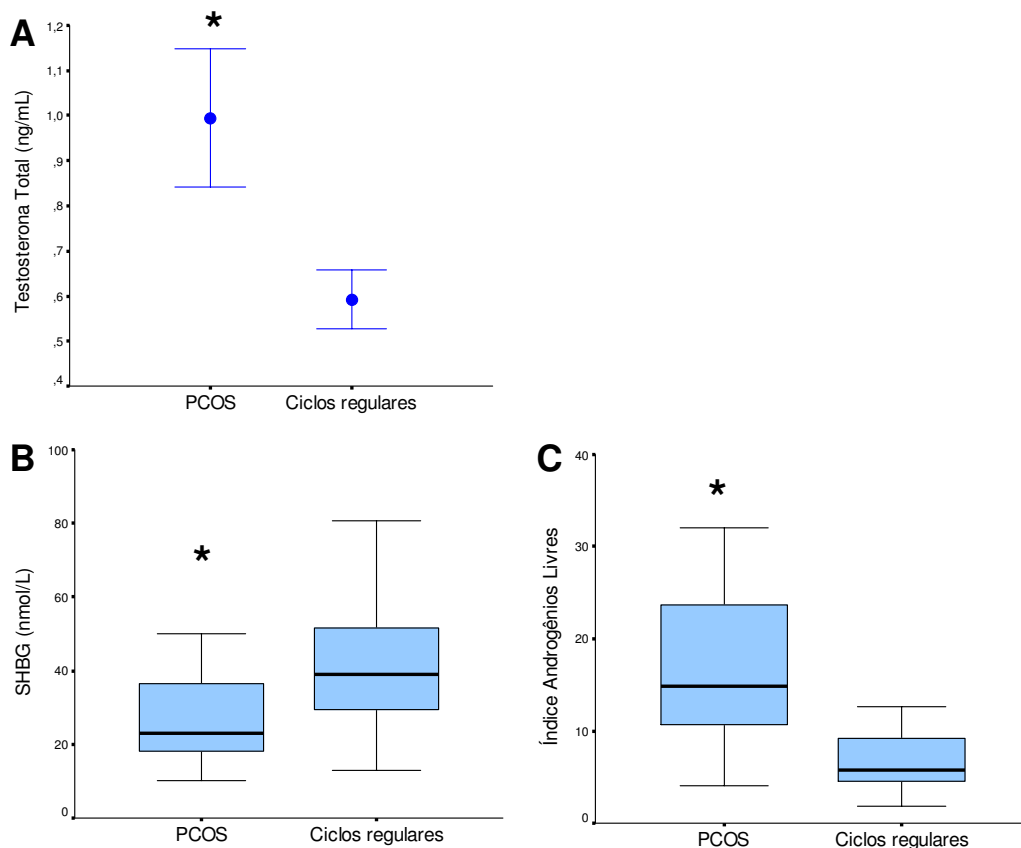


Figura 8. Parâmetros hormonais de pacientes com PCOS e mulheres com ciclos regulares. A) Níveis séricos de testosterona total ($P < 0,001$); B) Níveis séricos de SHBG ($P = 0,004$); C) Índice de Androgênios livres calculado ($P < 0,001$).

A figura 9 ilustra os níveis séricos de LH e a relação entre as medidas de LH e FSH. Com relação aos níveis de LH, o grupo PCOS apresentou níveis mais elevados que o grupo controle (medianas e intervalos interquartis de 7,15 [4,79 – 13,7] e 6,03 [3,77 – 7,71], respectivamente, $P = 0,04$). Observamos também uma diferença da relação LH/FSH entre os grupos, sendo que as pacientes com PCOS tiveram essa relação aumentada [1,79 (0,93 – 2,07)] (mediana e intervalo interquartil para o grupo controle foram de 0,87 [0,66 – 1,16], $P = 0,003$).

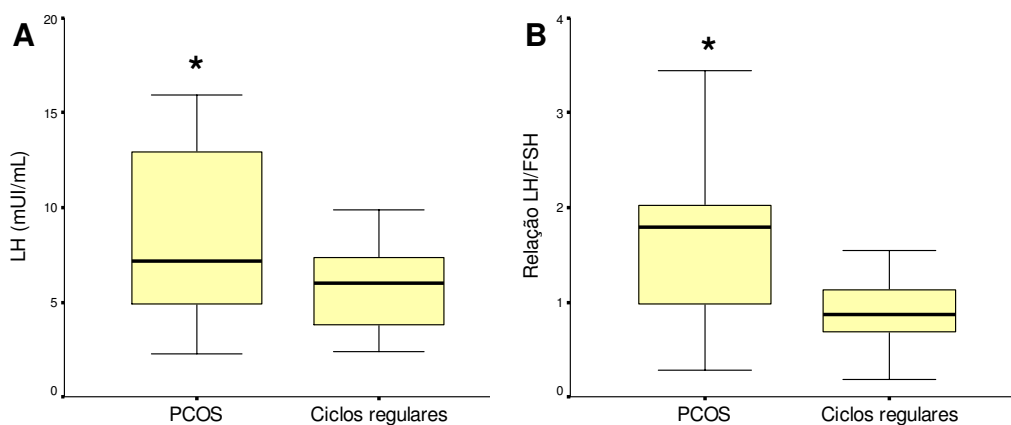


Figura 9. A) Níveis séricos de LH entre os grupos estudados ($P = 0,04$). B) Relação LH/FSH dessas pacientes ($P = 0,003$).

A análise da expressão gênica da aromatase nos folículos pilosos do vértice do escalpo foi realizada em uma sub-amostra do grande grupo de pacientes. A figura 10 ilustra a relação aromatase/ β_2m nesses dois subgrupos. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo PCOS [52,11 (5,68 – 84,8)] e o grupo de mulheres com ciclos regulares [80 (35,31 – 138,25, $P = 0,157$].

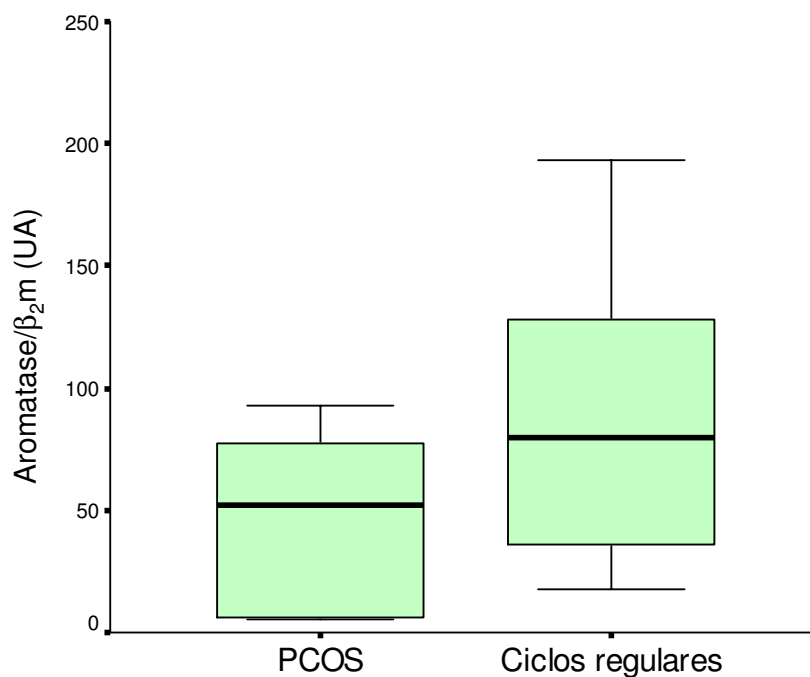


Figura 10. Expressão gênica da aromatase em pacientes com PCOS e mulheres com ciclos regulares. Os valores foram normalizados com a expressão do gene da β_2m . UA = unidades arbitrárias.

Para verificar possíveis associações da expressão gênica da aromatase com as variáveis estudadas, foram testadas algumas correlações, que são apresentadas na Tabela 5 e figura 11. Não houve correlações significativas com testosterona total, índice de androgênios livres ou insulina. No entanto, a expressão do gene da aromatase em folículos pilosos do escalpo de mulheres correlacionou-se negativamente e com significância estatística com os níveis séricos de LH ($P = 0,008$, $r = -0,653$) (figura 11).

Tabela 5. Correlações de Pearson entre o log da relação aromatase/ β_2m e variáveis hormonais e metabólicas.

Correlação	<i>P</i>	<i>r</i>
Log Aro/ β_2m X TT	0,101	-0,425
Log Aro/ β_2m X Log IAL	0,321	-0,265
Log Aro/ β_2m X Log Insulina	0,201	-0,338

TT = testosterona total; IAL = índice de androgênios livres

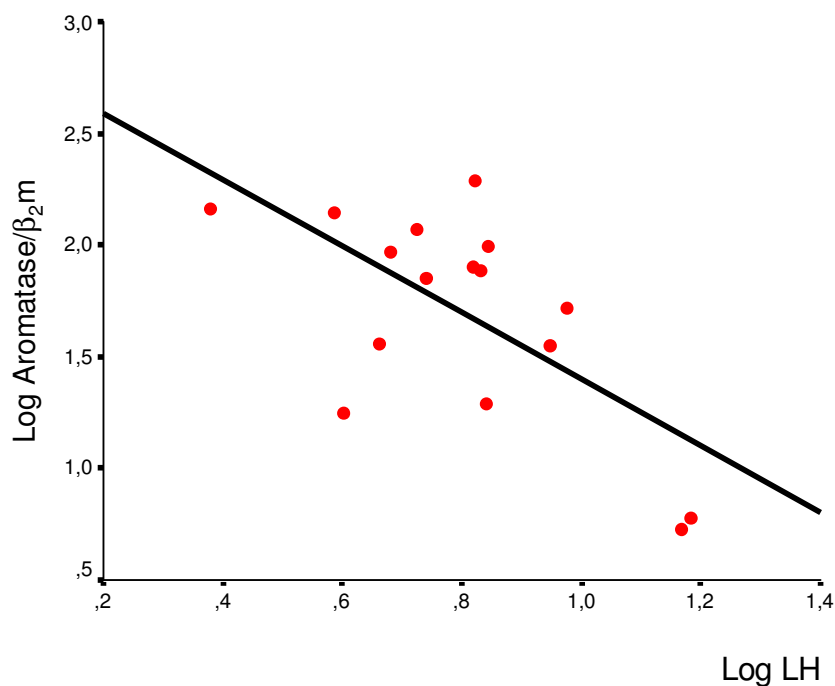


Figura 11. Correlação moderada entre a expressão da aromatase em folículos pilosos do vértice do escalpo e níveis séricos de LH ($P = 0,008$, $r = -0,653$).

Foi a seguir analisado se esta correlação era dependente de concentrações hormonais séricas. A tabela 6 mostra que a correlação negativa e significativa entre a expressão gênica da aromatase e os níveis séricos de LH é independente dos níveis séricos de testosterona total e SHBG.

Tabela 6. Correlações parciais do log da relação aromatase/ β_2m X log LH, controladas pelos níveis de testosterona total e SHBG.

Correlação	Variável controlada	P	r
Log Aro/ β_2m X Log LH	TT	0,029	-0,562
	Log SHBG	0,008	-0,653

6 DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se caracterizar alguns aspectos da fisiologia dos hormônios sexuais num tecido alvo específico que é o folículo piloso do escalpo feminino. Utilizou-se a região do vértice do escalpo, que é reconhecidamente sensível à ação destes hormônios (Oliveira, 2002). Para isso, foram recrutadas mulheres com ciclos regulares e ovulatórios e níveis circulantes de androgênios normais. Adicionalmente, estudou-se uma amostra de mulheres com a Síndrome dos ovários policísticos (PCOS), que apresentam níveis séricos aumentados de androgênios e que, portanto, poderiam contribuir para a avaliação das ações hormonais neste modelo de estudo. Cabe salientar que muitas das pacientes com PCOS apresentam também alterações metabólicas, entre elas a resistência insulínica, que poderiam ser de interesse para a análise realizada.

As pacientes com PCOS são oriundas do ambulatório da Unidade de Endocrinologia Ginecológica e o grupo de mulheres com ciclos ovulatórios é proveniente tanto do ambulatório quanto de chamamento pela mídia para participar de um estudo mais amplo, do qual o presente trabalho é parte integrante. Todas as mulheres, dos dois grupos, preencheram os critérios de idade de terem tido a menarca há pelo menos dois anos e de estarem no menacme, uma vez que alterações hormonais próprias do período pós-menopáusicas poderiam interferir com os resultados. Por outro lado, o fato de as pacientes com PCOS apresentarem menor idade média que o grupo de mulheres ovulatórias pode ser explicado por se tratar de uma endocrinopatia de início a partir da puberdade (Ehrmann, 2005), o que faz com que estas jovens procurem auxílio médico cedo em suas vidas.

Ambos os grupos em estudo foram emparelhados pelo IMC, cujo valor médio foi classificado como sobrepeso. Entretanto, as pacientes com PCOS apresentaram valor médio mais elevado para a relação cintura/quadril. Esse resultado está de acordo com Chang e colaboradores, que descrevem a obesidade em PCOS como sendo do tipo andróide, ou seja, caracterizada por um aumento de tecido adiposo visceral (Chang, 2004; Toscani *et al.*, 2007). É esse tipo de tecido adiposo que é metabolicamente ativo e que, quando aumentado, resulta em resistência insulínica, diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensão, condições essas associadas à PCOS (Lord e Wilkin, 2002; Spritzer e Wiltgen, 2007).

É bem conhecido que estas alterações hormonais e metabólicas observadas na PCOS estão associadas a uma maior prevalência de fatores de risco para doença cardiovascular (Guzick, 2004; Talbott *et al.*, 2001), embora as evidências sejam mais fortes para as outras comorbidades associadas, como diabetes tipo 2 (Norman *et al.*, 2007). Fatores isolados característicos da síndrome metabólica, como pressão arterial e perfil lipídico, freqüentemente estão alterados nas pacientes com PCOS. A alteração central para o desenvolvimento da síndrome metabólica parece ser a resistência insulínica e hiperinsulinemia secundária (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2007). No presente estudo, estes dados foram confirmados, pois o grupo PCOS apresentou valores de pressão arterial sistólica e diastólica mais elevados em relação ao grupo controle. Da mesma forma, as pacientes com PCOS tiveram níveis médios de HDL-colesterol mais baixos que o das mulheres com ciclos ovulatórios. Além disso, os níveis séricos de insulina e o índice HOMA, considerado um marcador de resistência à insulina, foram mais elevados nas pacientes com PCOS do que nas mulheres com ciclos regulares, confirmando a maior prevalência de resistência insulínica na PCOS (Dunaif, 1997).

Apesar de não ser um critério para o diagnóstico, observa-se que pacientes com PCOS apresentam, com freqüência, níveis mais elevados de LH quando comparadas com mulheres sem a síndrome (Fauser *et al.*, 1991). Concentrações elevadas de LH podem ser observadas em 40-60% das pacientes (Balen *et al.*, 1995). Essa característica decorre de alterações na pulsatilidade do GnRH, que se traduzem por um padrão anormal de pulsatilidade das gonadotrofinas, com secreção excessiva de LH estimulando as células da teca a produzirem androgênios, mas níveis normais de FSH (Rebar *et al.*, 1976). Dessa forma, outra característica da endocrinopatia verificada no nosso estudo, é a elevação da relação LH/FSH, que contribui para a secreção acíclica de androgênios ovarianos e sua conversão periférica em estrogênios (Spritzer, 2002).

Cerca de 60-80% das mulheres com PCOS apresentam altas concentrações de testosterona circulante, sendo que o hirsutismo é a manifestação clínica mais freqüente nessas pacientes (Chang *et al.*, 2005). Nosso grupo de pacientes com PCOS apresentou níveis de testosterona total mais elevado e grau de hirsutismo mais pronunciado, como se pode verificar pelos valores médios do escore de Ferriman modificado.

Em algumas mulheres com PCOS, outras fontes podem ser as responsáveis pela hipersecreção de androgênios (Carmina, 2006). Estima-se que 25% das portadoras de PCOS apresentem níveis elevados de DHEAS (Kumar *et al.*, 2005). Como o DHEAS é secretado principalmente pelas adrenais, presumimos que os níveis semelhantes encontrados entre os grupos do nosso estudo refletem que o hiperandrogenismo das pacientes com PCOS é predominantemente decorrente de hiperprodução ovariana.

As células da teca do ovário ficam mais responsivas às gonadotrofinas e como resultado produzem androgênios em excesso, fato associado ao excesso de LH e à presença de hiperinsulinemia. Em 30 a 60% dos casos de PCOS, em especial nas pacientes obesas, a hiperinsulinemia secundária à resistência insulínica estará presente (Nestler e Jakubowicz, 1996; Spritzer, 2002). A insulina em altas concentrações atua de maneira sinérgica com o LH, e propõe-se que o hiperandrogenismo mediado pela ação da insulina ocorra por meio da sua ligação a receptores ovarianos para IGF-I (Dunaif, 1997). Além disso, a insulina amplifica os efeitos da testosterona por supressão da produção hepática de SHBG (Balen, 2004). Isso se traduz pelo aumento no índice de androgênios livres, ou seja, disponível para ação em tecidos periféricos como o folículo piloso.

O hirsutismo representa uma disfunção de grande impacto psico-social, decorrente da ação dos androgênios sobre a pele e dependente de vários fatores correlacionados, tais como níveis de androgênios e da SHBG e conseqüente relação hormônio livre/hormônio ligado, além da capacidade de conversão de androgênios em estrogênios (Spritzer, 2002). A produção de estrogênios via precursores androgênicos e a ação da enzima aromatase são de grande importância para o metabolismo local de tecidos como o folículo piloso (Thornton *et al.*, 2006). A técnica do arrancamento que utilizamos para a coleta dos folículos pilosos das mulheres participantes é validada para estudos da expressão gênica de enzimas envolvidas na esteroidogênese (Oliveira *et al.*, 2003a; b). Por meio dessa técnica, extrai-se RNA das porções de origem epitelial do folículo piloso, principalmente das bainhas radiculares externa e interna. Não há como realizar a análise da expressão de genes da papila dérmica, visto que essa porção do folículo piloso só pode ser analisada quando são realizadas biópsias da pele. A biópsia é um método invasivo de coleta, exige a utilização de uma sala asséptica e é mais difícil de ser aceita pelas pacientes do que o método do arrancamento.

Nesse estudo, analisamos a expressão do gene da aromatase em folículos pilosos do vértice do escalpo de mulheres. Outros pesquisadores já haviam detectado a presença da enzima em folículos pilosos provenientes de outras regiões. Sawaya e Price compararam a atividade da aromatase em folículos da região occipital e frontal do escalpo (Sawaya e Price, 1997). Lachgar e colegas (Lachgar *et al.*, 1999) estudaram a localização da aromatase em folículos da região occipital do escalpo, enquanto Thornton e colaboradores (Thornton *et al.*, 2006) realizaram cultura de células da papila dérmica proveniente de pêlos da barba de homens para análise da expressão da enzima. Entretanto, nenhum estudo que analisou a expressão gênica ou protéica da aromatase utilizou folículos pilosos da região do vértice do escalpo. A utilização de folículos provenientes dessa região é uma boa alternativa para estudos de influência hormonal em mulheres. Sabe-se que a região da barba de homens é dependente de androgênios, assim como a região pubiana de ambos os sexos; a região do vértice do escalpo é sensível aos hormônios, podendo apresentar miniaturização frente à maior concentração de androgênios circulante (Oliveira, 2002). Visto que o nosso objetivo é o melhor entendimento das manifestações locais do hiperandrogenismo em mulheres, deve-se optar por regiões que sejam mais responsivas a esses hormônios, em detrimento de regiões independentes de androgênios (como a occipital e a frontotemporal), que são utilizadas por outros autores.

O presente modelo de estudo permitiu determinar que a região do vértice do escalpo de mulheres, em idade reprodutiva, expressa o gene da aromatase, embora esta expressão seja de fraca intensidade. Courchay e colaboradores já haviam relatado baixa intensidade de expressão gênica da aromatase em folículos pilosos da região occipital obtidos pelo método do arrancamento, se comparada a outros tecidos utilizados como controles positivos (placenta, ovário e útero), utilizando a metodologia de PCR convencional (Courchay *et al.*, 1996).

Por outro lado, o papel dos androgênios sobre a atividade da aromatase ou sua expressão gênica é ainda controverso. Dados da literatura indicam que androgênios podem modular a expressão da aromatase, dependendo do gênero e da região estudada. Stillman e colegas analisaram fibroblastos da região genital de homens normais. Após a incubação com testosterona ou DHT por 48 horas, a atividade da aromatase aumentou aproximadamente 5 vezes se comparada ao controles (Stillman *et al.*, 1991). Lachgar e colegas mostraram que a associação de

diferentes tratamentos em cultura de células da PD provenientes de folículos da região occipital, como a suplementação com inibidor da 5α -R e antagonista do receptor de androgênios, podem aumentar a expressão gênica da aromatase (Lachgar *et al.*, 1999). Em estudo comparando a atividade da aromatase em cultura de folículos obtidos de biópsias da região occipital, Hoffmann e colegas demonstraram que 17α -estradiol induziu a atividade enzimática e que folículos de mulheres expressaram mais aromatase que os folículos de homens, sugerindo que androgênios possam ter uma influência inibitória sobre a aromatase (Hoffmann *et al.*, 2002).

No presente estudo, a comparação da expressão gênica da aromatase nos folículos pilosos de pacientes com PCOS e de mulheres com ciclos regulares não mostrou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, apesar do uso de metodologias diferentes e do nosso enfoque no estudo de mulheres em idade reprodutiva, com a observação complementar do que ocorre com pacientes com hiperandrogenismo, nossos resultados se assemelham aos achados *in vitro* de Thornton e colaboradores. Após análise de expressão gênica de células da PD de folículos pilosos da região occipital do escalpo e da barba de homens cultivadas em diferentes meios, esses pesquisadores demonstraram que não houve diferença dos padrões de expressão de aromatase nas células suplementadas com testosterona ou DHT em relação às células não tratadas (Thornton *et al.*, 2006).

É conhecido que a papila dérmica é o centro de comando do folículo piloso, e é dependente da ação androgênica. De acordo com o modelo proposto por Randall, em 1991, os androgênios agem diretamente nas células da PD por ligação aos seus receptores específicos, iniciando assim a alteração da expressão gênica de fatores regulatórios que influenciam outras células-alvo (Randall *et al.*, 1991). Dessa forma, a PD seria o alvo direto da ação androgênica, enquanto outras células como queratinócitos e melanócitos seriam alvos indiretos (Randall, 2007). Não podemos, portanto, excluir que a expressão do gene da aromatase seja mais intensa e sofra regulação por androgênios quando o tecido estudado é diretamente a PD. Por outro lado, como as células da BRE e BRI estão na porção epitelial, é possível que a regulação do balanço estrogênico no metabolismo dos folículos pilosos não seja tão pronunciada nessa região.

A ausência de diferença na expressão gênica da aromatase entre os grupos não implica que não haja eventuais diferenças na atividade enzimática local.

Entretanto, os procedimentos para medir atividade enzimática e também a expressão desta proteína dependem de maiores quantidades de tecido, que não é possível obter com a metodologia de arrancamento utilizada. É importante, por outro lado, assinalar que o método desenvolvido no laboratório tem grande valor para avaliação inicial de caracterização de expressão de genes específicos, como foi o caso determinação da expressão do gene da aromatase, verificada no presente trabalho. Estudos futuros, utilizando folículos pilosos de pacientes em uso de anticoncepcionais (com administração exógena de estrogênios) ou de antiandrogênios, poderão trazer novas evidências a esta questão. Além disso, por apresentar grande sensibilidade, a técnica de PCR em tempo real utilizada é capaz de evidenciar mesmo uma expressão muito baixa de determinado gene. Isso pode explicar a dispersão dos dados da expressão gênica da aromatase, observada principalmente, no grupo de mulheres com ciclos regulares e ovulatórios. No futuro, será importante arrolar novas voluntárias, controlando algumas variáveis, como a idade, fase do ciclo e uso de anticoncepcionais orais. Um outro aspecto que merece ser mencionado é o projeto de se estudar a expressão do gene da aromatase em pacientes portadoras de alopecia androgenética.

Considera-se que o microambiente hormonal nos folículos pilosos possa sofrer a influência dos níveis circulantes de hormônios. Além disso, este tecido é capaz de utilizar estes hormônios como precursores que podem ser convertidos em metabólitos mais ou menos ativos (Deplewski e Rosenfield, 2000; Ohnemus *et al.*, 2006). Folículos pilosos são tecidos de interação, não devem ser vistos apenas como receptores de sinais de outros órgãos endócrinos (Zouboulis, 2000). Essa capacidade de coordenar sinais moleculares de diversas fontes nos mostra que existe uma maior complexidade na associação entre níveis séricos e expressão gênica local. Outros co-reguladores da transcrição intrínsecos ao metabolismo próprio dos folículos pilosos devem estar envolvidos na manutenção desse padrão de expressão gênica no tecido, tanto em condições clínicas de hiperandrogenismo como em condições normais.

A análise de associação da expressão gênica da aromatase com variáveis hormonais realizada no presente estudo pretendeu avaliar esta questão incluindo mulheres com grande variação nos níveis de androgênios pertencentes aos 2 grupos em estudo. Não se observaram correlações significativas, exceto para os níveis de LH cuja correlação foi negativa e significativa. É possível que o LH

represente um marcador de PCOS nesta amostra de mulheres e que a correlação negativa encontrada reflita mais o conjunto das alterações metabólicas e hormonais característico desta Síndrome. O método estatístico ideal para confirmar esta hipótese seria um modelo de regressão logística, o que não é factível nas condições atuais, devido à necessidade de um número muito grande de indivíduos a serem estudados. A complexidade da associação entre variáveis hormonais e a expressão gênica local pode, no entanto, ser verificada de forma aceitável utilizando-se análises de regressão parcial. No presente estudo, o ajuste da correlação entre expressão gênica da aromatase e níveis de LH, pela testosterona ou pela SHBG, mostrou que esta relação negativa é independente destes hormônios e que, efetivamente, um conjunto mais amplo de fatores pode estar, pelo menos em parte, envolvido com a expressão do gene da aromatase no folículo piloso do vértice do escalpo em mulheres e sua associação negativa com o LH.

Estudos acerca da influência hormonal em órgãos periféricos são bastante relevantes para o entendimento de manifestações clínicas que acompanham o hiperandrogenismo, como o hirsutismo e a alopecia. Além disso, novas alternativas terapêuticas podem advir dessa compreensão. Além de métodos de análise da atividade enzimática anteriormente sugeridos, estudos subseqüentes utilizando pacientes hirsutas de outras etiologias, portadoras de alopecia ou o estudo de outras regiões pilosas hormônio-dependentes poderão confirmar o padrão de expressão gênica da aromatase nos folículos pilosos. A análise da expressão gênica e protéica do receptor de estrogênios nesse tecido pode ser importante para o melhor entendimento do metabolismo local de esteróides em mulheres em condições normais e de hiperandrogenismo. Por fim, o estudo de mulheres sob influência de medicamentos antiandrogênicos e associação com variáveis clínicas, hormonais e metabólicas ao longo do tratamento podem auxiliar no entendimento da complexidade de interações que ocorre nos folículos pilosos.

7 CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho permitem concluir que:

1) Folículos pilosos da região do vértice do escalpo de mulheres, obtidos pela técnica do arrancamento e utilizando a PCR em tempo real, expressam o gene da aromatase.

Este resultado, descrito neste trabalho pela primeira vez, representa um importante modelo para estudo dos mecanismos regulatórios do metabolismo de estrogênios no folículo piloso, através de um processo simples e acurado de obtenção de material biológico.

2) A expressão gênica da aromatase, nas condições experimentais do presente trabalho, foi similar em mulheres com ciclos ovulatórios e androgênios normais e pacientes com PCOS.

A análise de co-ativadores e co-repressores da transcrição, que não foram investigados nesse estudo, poderá evidenciar os mecanismos que regulam a manutenção desse padrão de expressão gênica da aromatase e a modulação das concentrações intra-teciduals de esteróides.

3) Foi verificada correlação negativa e independente entre expressão gênica da aromatase e níveis séricos de LH.

Este resultado pode estar associado ao conjunto das alterações metabólicas e hormonais presentes nas pacientes com PCOS e estudos complementares com delineamento específico para regressão logística são necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso L e Fuchs E (2006). The hair cycle. **J Cell Sci** 119(Pt 3): 391-393.
- Alonso LC e Rosenfield RL (2003). Molecular genetic and endocrine mechanisms of hair growth. **Horm Res** 60(1): 1-13.
- Anderson KM e Liao S (1968). Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. **Nature** 219(5151): 277-279.
- Applied-Biosystems (2005). Chemistry Guide.
- Balen A (2004). The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 18(5): 685-706.
- Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, *et al.* (1995). Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. **Hum Reprod** 10(8): 2107-2111.
- Blanpain C e Fuchs E (2006). Epidermal stem cells of the skin. **Annu Rev Cell Dev Biol** 22: 339-373.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, *et al.* (2003). The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. **J Steroid Biochem Mol Biol** 86(3-5): 219-224.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol** 25(2): 169-193.
- Callard GV, Petro Z e Ryan KJ (1978). Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. **Endocrinology** 103(6): 2283-2290.
- Carmina E (2006). Ovarian and adrenal hyperandrogenism. **Ann N Y Acad Sci** 1092: 130-137.
- Chang RJ (2004). A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. **Am J Obstet Gynecol** 191(3): 713-717.

Chang WY, Knochenhauer ES, Bartolucci AA e Azziz R (2005). Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. **Fertil Steril** 83(6): 1717-1723.

Chen W, Thiboutot D e Zouboulis CC (2002). Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. **J Invest Dermatol** 119(5): 992-1007.

Comim FV e Spritzer PM (2004). Increased growth hormone response to clonidine in nonobese normoinsulinemic patients with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 81(1): 108-113.

Courchay G, Boyera N, Bernard BA e Mahe Y (1996). Messenger RNA expression of steroidogenesis enzyme subtypes in the human pilosebaceous unit. **Skin Pharmacol** 9(3): 169-176.

Deplewski D e Rosenfield RL (2000). Role of hormones in pilosebaceous unit development. **Endocr Rev** 21(4): 363-392.

Diamanti-Kandarakis E, Christakou C e Kandarakis H (2007). Polycystic ovarian syndrome: the commonest cause of hyperandrogenemia in women as a risk factor for metabolic syndrome. **Minerva Endocrinol** 32(1): 35-47.

Dunaif A (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr Rev** 18(6): 774-800.

Ebling FJ (1988). The hair cycle and its regulation. **Clin Dermatol** 6(4): 67-73.

Ehrmann DA (2005). Polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med** 352(12): 1223-1236.

Fauser BC, Pache TD, Lamberts SW, *et al.* (1991). Serum bioactive and immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in women with cycle abnormalities, with or without polycystic ovarian disease. **J Clin Endocrinol Metab** 73(4): 811-817.

Fuchs E (2007). Scratching the surface of skin development. **Nature** 445(7130): 834-842.

Goodarzi MO e Azziz R (2006). Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 20(2): 193-205.

Guzick DS (2004). Polycystic ovary syndrome. **Obstet Gynecol** 103(1): 181-193.

Hamilton JB (1950). Quantitative measurement of a secondary sex character, axillary hair. **Annals of the New York Academy of Sciences** 53: 585-599.

Harada N, Yamada K, Saito K, *et al.* (1990). Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. **Biochem Biophys Res Commun** 166(1): 365-372.

Hardy MH (1992). The secret life of the hair follicle. **Trends Genet** 8(2): 55-61.

Hart R, Hickey M e Franks S (2004). Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 18(5): 671-683.

Hoffmann R (2001). Enzymology of the hair follicle. **Eur J Dermatol** 11(4): 296-300.

Hoffmann R, Niiyama S, Huth A, *et al.* (2002). 17 α -estradiol induces aromatase activity in intact human anagen hair follicles *ex vivo*. **Exp Dermatol** 11(4): 376-380.

Jahoda CA e Reynolds AJ (1996). Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. **Dermatol Clin** 14(4): 573-583.

Kishida M e Callard GV (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. **Endocrinology** 142(2): 740-750.

Krause K e Foitzik K (2006). Biology of the hair follicle: the basics. **Semin Cutan Med Surg** 25(1): 2-10.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, *et al.* (2006). The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med** 27(2-3): 95-125.

Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA e Azziz R (2005). Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). **Clin Endocrinol (Oxf)** 62(6): 644-649.

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, *et al.* (2000). Intracrinology and the skin. **Horm Res** 54(5-6): 218-229.

Lachgar S, Charveron M, Sarraute J, *et al.* (1999). In vitro main pathways of steroid action in cultured hair follicle cells: vascular approach. **J Invest Dermatol Symp Proc** 4(3): 290-295.

Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, *et al.* (1997). Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). **Am J Pathol** 151(6): 1601-1617.

Lord J e Wilkin T (2002). Polycystic ovary syndrome and fat distribution: the central issue? **Hum Fertil (Camb)** 5(2): 67-71.

Maderson PF (1972). When? Why? and How? Some speculations on the evolution of the vertebrate integument. **American Zoologist** 12: 159-171.

Maderson PF (2003). Mammalian skin evolution: a reevaluation. **Exp Dermatol** 12(3): 233-236.

Means GD, Mahendroo MS, Corbin CJ, *et al.* (1989). Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **J Biol Chem** 264(32): 19385-19391.

Mecklenburg L, Tobin DJ, Muller-Rover S, *et al.* (2000). Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. **J Invest Dermatol** 114(5): 909-916.

Mendelson CR, Jiang B, Shelton JM, *et al.* (2005). Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. **J Steroid Biochem Mol Biol** 95(1-5): 25-33.

Millar SE (2002). Molecular mechanisms regulating hair follicle development. **J Invest Dermatol** 118(2): 216-225.

Nestler JE e Jakubowicz DJ (1996). Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med** 335(9): 617-623.

Norman RJ, Dewailly D, Legro RS e Hickey TE (2007). Polycystic ovary syndrome. **Lancet** 370(9588): 685-697.

Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, *et al.* (2006). The hair follicle as an estrogen target and source. **Endocr Rev** 27(6): 677-706.

Oliveira IO (2002). Expressão gênica do receptor de androgênios, das enzimas 5-alfa redutase tipos 1 e 2, e da 17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 no escalpo de mulheres hirsutas. Departamento de Fisiologia. Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: 171.

Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS e Spritzer PM (2003a). The 5alpha-reductase type 1, but not type 2, gene is expressed in anagen hairs plucked from the vertex area of the scalp of hirsute women and normal individuals. **Braz J Med Biol Res** 36(10): 1447-1454.

Oliveira IO, Lhullier C, Brum IS e Spritzer PM (2003b). Gene expression of type 2 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase in scalp hairs of hirsute women. **Steroids** 68(7-8): 641-649.

Orfanos CE, Adler YD e Zouboulis CC (2000). The SAHA syndrome. **Horm Res** 54(5-6): 251-258.

Panteleyev AA, Jahoda CA e Christiano AM (2001). Hair follicle predetermination. **J Cell Sci** 114(Pt 19): 3419-3431.

Panteleyev AA, Paus R e Christiano AM (2000). Patterns of hairless (hr) gene expression in mouse hair follicle morphogenesis and cycling. **Am J Pathol** 157(4): 1071-1079.

Paus R e Foitzik K (2004). In search of the "hair cycle clock": a guided tour. **Differentiation** 72(9-10): 489-511.

Paus R, Muller-Rover S, Van Der Veen C, *et al.* (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. **J Invest Dermatol** 113(4): 523-532.

Primer3Output www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi.

Randall VA (2007). Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. **Semin Cell Dev Biol**.

Randall VA, Hibberts NA, Thornton MJ, *et al.* (2000). The hair follicle: a paradoxical androgen target organ. **Horm Res** 54(5-6): 243-250.

Randall VA, Thornton MJ, Hamada K, *et al.* (1991). Androgens and the hair follicle. Cultured human dermal papilla cells as a model system. **Ann N Y Acad Sci** 642: 355-375.

Rebar R, Judd HL, Yen SS, *et al.* (1976). Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. **J Clin Invest** 57(5): 1320-1329.

Resing KA e Dale BA (1991). Proteins of keratohyalin. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin. Oxford:eOU Press. Goldsmith L A. **2**: 148-167.

Reynolds EL (1951). The appearance of adult patterns of body hair in man. **Ann N Y Acad Sci** 53(3): 576-584.

Rogers GE (2004). Hair follicle differentiation and regulation. **Int J Dev Biol** 48(2-3): 163-170.

Sawaya ME e Penneys NS (1992). Immunohistochemical distribution of aromatase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human hair follicle and sebaceous gland. **J Cutan Pathol** 19(4): 309-314.

Sawaya ME e Price VH (1997). Different levels of 5 α -reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. **J Invest Dermatol** 109(3): 296-300.

Schweikert HU, Milewich L e Wilson JD (1975). Aromatization of androstenedione by isolated human hairs. **J Clin Endocrinol Metab** 40(3): 413-417.

Simpson ER (2002). Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. **Fertil Steril** 77 Suppl 4: S6-10.

Simpson ER, Clyne C, Rubin G, *et al.* (2002). Aromatase--a brief overview. **Annu Rev Physiol** 64: 93-127.

Spritzer PM (2002). Revisitando o hirsutismo. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia** 46(2): 127-136.

Spritzer PM, Lisboa KO, Mattiello S e Lhullier F (2000). Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. **Clin Endocrinol (Oxf)** 52(5): 587-594.

Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, *et al.* (2001). Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. **Hum Reprod** 16(7): 1340-1346.

Spritzer PM e Wiltgen D (2007). Prevalência de síndrome metabólica em pacientes sul-brasileiras com síndrome dos ovários policísticos. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 51(1): 146-147.

Stenn KS e Paus R (1999). What controls hair follicle cycling? **Exp Dermatol** 8(4): 229-233; discussion 233-226.

Stenn KS e Paus R (2001). Controls of hair follicle cycling. **Physiol Rev** 81(1): 449-494.

Stillman SC, Evans BA e Hughes IA (1991). Androgen dependent stimulation of aromatase activity in genital skin fibroblasts from normals and patients with androgen insensitivity. **Clin Endocrinol (Oxf)** 35(6): 533-538.

Talbott EO, Zborowski JV, Sutton-Tyrrell K, *et al.* (2001). Cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. **Obstet Gynecol Clin North Am** 28(1): 111-133, vii.

Thornton MJ, Nelson LD, Taylor AH, *et al.* (2006). The modulation of aromatase and estrogen receptor alpha in cultured human dermal papilla cells by dexamethasone: a novel mechanism for selective action of estrogen via estrogen receptor beta? **J Invest Dermatol** 126(9): 2010-2018.

Toda K, Terashima M, Kawamoto T, *et al.* (1990). Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. **Eur J Biochem** 193(2): 559-565.

Toscani M, Migliavacca R, Sisson de Castro JA e Spritzer PM (2007). Estimation of truncal adiposity using waist circumference or the sum of trunk skinfolds: a pilot study for insulin resistance screening in hirsute patients with or without polycystic ovary syndrome. **Metabolism** 56(7): 992-997.

Vermeulen A, Verdonck L e Kaufman JM (1999). A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. **J Clin Endocrinol Metab** 84(10): 3666-3672.

Zawadzki JK e Dunaif A (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. Polycystic Ovary Syndrome. BS Publications. Boston: 377-384.

Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, *et al.* (2003). Quantitative determination, by real-time reverse transcription polymerase chain reaction, of aromatase mRNA in invasive ductal carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res** 5(6): R250-256.

Zouboulis CC (2000). Human skin: an independent peripheral endocrine organ. **Horm Res** 54(5-6): 230-242.