

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU

**APOPTOSE, MICROINFLAMAÇÃO E EXPRESSÃO DE
RECEPTORES DE HIDROCARBONETO ARÍLICO NOS FOLÍCULOS
PILOSOS DE PACIENTES COM ALOPECIA DE PADRÃO FEMININO**

PAULO MÜLLER RAMOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Patologia
da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Patologia.

BOTUCATU – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU

**APOPTOSE, MICROINFLAMAÇÃO E EXPRESSÃO DE
RECEPTORES DE HIDROCARBONETO ARÍLICO NOS FOLÍCULOS
PILOSOS DE PACIENTES COM ALOPECIA DE PADRÃO FEMININO**

MESTRANDO: PAULO MÜLLER RAMOS

ORIENTADOR: HÉLIO AMANTE MIOT

CO-ORIENTADOR: MARIÂNGELA E. A. MARQUES

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Patologia
da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Patologia.

BOTUCATU – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Ramos, Paulo Müller.

Apoptose, microinflamação e expressão de receptores de hidrocarboneto
arílico nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino / Paulo
Müller Ramos. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Helio Amante Miot

Coorientador: Mariângela E. A. Marques

Capes: 40105008

1. Apoptose. 2. calvície. 3. Dioxinas. 4. Estudos transversais. 5. Mulheres -
Doenças.

Palavras-chave: Alopecia androgênica; Apoptose; Dioxinas; Inflamação.

Dedicatória

À minha mãe, **Magdalena**

Fonte eterna de amor e carinho.

Ao meu pai, **Valter**

Meu grande exemplo e maior apoiador.

Minha esposa, **Ana Paula**

Amada, amiga e companheira para toda a vida.

Minha irmã, **Carla**

Pessoa admirável, ao meu lado desde os primeiros passos.

Agradecimento especial

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Hélio Amante Miot**. Agradeço pela enorme contribuição na minha formação desde a residência médica. Além disso, a execução desse trabalho nunca seria possível se não fosse a sua extrema disponibilidade em orientar. Obrigado pelas oportunidades que me ofereceu, os caminhos que apontou e o grande empenho no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a **Dra. Luciane Donida Bartoli Miot**, por todo suporte e forma carinhosa que sempre me recebeu em sua casa.

Espero que, independentemente de trabalhos futuros, possa sempre partilhar da amizade de vocês.

Agradecimento

À minha amada **família**. Por todo amor, carinho e suporte.

Aos docentes, médicos e funcionários do **Departamento de Dermatologia**. Pelo apoio que sempre recebi.

Aos funcionários do **Departamento de Patologia**, e em especial ao **Marcos Franchi** pela fundamental participação na realização das técnicas laboratoriais.

À **Prof. Dra. Mariângela E. A. Marques**, por suas orientações para desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Juliano V. Schmitt** e à **Prof. Dra. Luciana Patrícia F. Abbade** pelas críticas e sugestões que foram fundamentais para finalização do texto.

À **Prof. Dra Marcia Guimarães da Silva** e a **Doutoranda Ana Carolina P. Martins** por possibilitarem a realização do TUNEL.

Aos **funcionários da Pós-Graduação**, em especial, à **Vania Soler** que sempre mostrou-se extremamente prestativa.

Aos funcionários do **ambulatório de Dermatologia**, pela ajuda no atendimento aos pacientes.

À **FUNADERSP** pelo financiamento que propiciou a realização do trabalho.

Trabalho realizado no ambulatório do
Departamento de Dermatologia e Radioterapia
e no Departamento de Patologia da FMB-
Unesp.

Sumário

Índice de abreviaturas	9
Primeiro manuscrito	10
Objetivos	55
Segundo manuscrito	56
Conclusões.....	76
Perspectivas.....	77
Apêndices.....	79
Anexos	87

Índice de abreviaturas

5 α R – 5 alfa-redutase

AC – Antes de Cristo

APF – Alopecia de padrão feminino

APM – Alopecia de padrão masculino

bFGF – Fator de crescimento básico de fibroblasto

DAC – Doença arterial coronariana

DECS – Descritores em ciências da saúde

DHT – di-hidrotestosterona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

FAI – Índice de androgênio livre

FGF5 – Fator de crescimento de fibroblasto 5

FGF7 – Fator de crescimento de fibroblasto 7

HGF – Fator crescimento hepatócitos

HR – Razão de risco

IGF-1 – Fator crescimento semelhante insulina-1

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

OR – Razão de chances

PGD₂ – Prostaglandina D₂

PGE₂ – Prostaglandina E₂

RA – Receptor de androgênio

SHBG – Globulina de ligação a hormônio sexual

SOP – Síndrome dos ovários policísticos

T – Testosterona

TGF- β 1 – Fator de transformação de crescimento beta 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VOLP – Vocabulário ortográfico da língua portuguesa

WAA-QOL – Questionário de qualidade de vida relacionado à APF

WNT – Via de sinalização Wnt

XRE – elemento de resposta xenobiótica

Resumo

Alopecia de padrão feminino, ou alopecia androgenética feminina, é a principal causa de queda de cabelos em mulheres adultas, e inflige importante impacto na qualidade de vida das pacientes. Decorre da progressiva miniaturização de folículos pilosos e posterior diminuição da densidade dos fios, originando um quadro de alopecia difusa não cicatricial, com padrão clínico, dermatoscópico e histológico característicos.

Apesar da elevada frequência e da relevância quanto ao impacto psicológico, sua fisiopatogenia não é ainda totalmente esclarecida, sofrendo influência de elementos genéticos, hormonais e ambientais. Além disso, a resposta ao tratamento é inconstante.

Os receptores de hidrocarboneto arílico (AhR) podem ser ativados por diversos ligantes ambientais como poluentes (p. ex. dioxinas), fumaça do tabaco, radiação ultravioleta e pela ação microbiana (p.ex. Malassezia sp.), podendo exercer atividade proinflamatória, proapoptótica, hormonal e carcinogênica, de acordo com o fator ativador e tecido alvo. Sua ação no folículo piloso e na alopecia de padrão feminino não foi ainda estudada.

Neste trabalho, os autores avaliam a apoptose, infiltrado inflamatório e expressão de receptores de hidrocarboneto arílico nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.

Foi conduzido um estudo transversal envolvendo 17 mulheres com alopecia de padrão feminino e cinco controles. Avaliaram-se amostras de pele do couro cabeludo que foram processados para HE, técnica do TUNEL e imuno-

histoquímica para receptor de hidrocarboneto arílico. As variáveis foram comparadas de acordo com o grupo de folículos (terminal *versus* miniaturizado) e os grupos de pacientes (alopecia *versus* controles).

Houve maior índice de apoptose (TUNEL) entre os folículos miniaturizados e entre os casos, além de significativa interação entre a categoria folicular e casos ($p < 0,01$). Folículos miniaturizados apresentaram maior escore de expressão nuclear de receptor de hidrocarboneto arílico ($p = 0,03$), observando-se correlação independente entre a marcação citoplasmática e nuclear nos folículos ($p < 0,01$). Houve correlação entre o infiltrado inflamatório e a apoptose nos folículos miniaturizados ($r_s = 0,68$; $p = 0,01$).

Em conclusão, apoptose, microinflamação e receptor de hidrocarboneto arílico apresentaram padrões característicos nos pacientes com alopecia de padrão feminino. Receptor de hidrocarboneto arílico pode ser uma via de promoção da apoptose e miniaturização dos fios induzida por estímulos ambientais.

Palavras-chave: Alopecia, Alopecia androgênica, Cabelo, Epidemiologia, Feminino, Folículo piloso, Miniaturização, Androgênios, Apoptose, Dioxinas, Inflamação.

Primeiro manuscrito

Artigo de revisão em português no formato dos Anais Brasileiros de Dermatologia

Título: Alopecia de padrão feminino: revisão clínica e fisiopatológica.

Title: Female pattern alopecia: a clinical and physiopathological review.

Autores:

Paulo Müller Ramos

Médico dermatologista, Mestrando em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Hélio Amante Miot

Médico Dermatologista, Professor assistente doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Local de desenvolvimento do trabalho:

Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Conflito interesse: Nenhum

Financiamento: FUNADERSP: no. 01/2013

RESUMO

Alopecia de padrão feminino, ou alopecia androgenética feminina, é a principal causa de queda de cabelos em mulheres adultas, e inflige importante impacto na qualidade de vida das pacientes. Decorre da progressiva miniaturização de folículos pilosos e posterior diminuição da densidade dos fios, originando um quadro de alopecia difusa não cicatricial, com padrão clínico, dermatoscópico e histológico característicos.

Apesar da elevada frequência e da relevância quanto ao impacto psicológico, sua fisiopatogenia não é ainda totalmente esclarecida, sofrendo influência de elementos genéticos, hormonais e ambientais. Além disso, a resposta ao tratamento é inconstante.

Neste artigo, os autores discutem os principais aspectos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos da alopecia de padrão feminino.

Palavras-chave: Alopecia, Alopecia androgênica, Cabelo, Epidemiologia, Feminino, Folículo piloso, Miniaturização, Androgênios.

ABSTRACT

Female pattern alopecia, or female androgenetic alopecia, is the main cause of hair loss in adult women and causes major impact on patient's quality of life. It evolves from the progressive miniaturization of follicles that lead to a subsequent decrease of the hair density, leading to a non-scarring diffuse alopecia, with characteristic clinical, dermoscopic and histological pattern.

Despite the high frequency and relevance about the psychological impact, its pathogenesis is not yet fully understood, but is influenced by genetic, hormonal and environmental factors. In addition, response to treatment is incostant.

In this article, authors discuss the main clinical, epidemiological and physiopathological aspects of female pattern hair loss.

Key-words: Alopecia, Androgenetic Alopecia, Hair, Epidemiology, Female, Hair Follicle, Miniaturization, Androgens.

INTRODUÇÃO

Etmologicamente, a palavra alopecia deriva do grego *ἀλώπηξ* (*alōpēx*) que significa “raposa”, em alusão à frequente queda de pelos que esse animal sofre durante a vida. Segundo o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa (VOLP), alopecia deve ser escrita sem o acento (pronúncia paroxítona), devido à influência do termo em latim (*alopecia*) na formação de nosso idioma. Também dessa forma é registrado entre os descritores para ciência da saúde (DECS) para a indexação científica, no Brasil.¹⁻³

A descrição do padrão clínico clássico da calvície que acomete principalmente os homens é conhecida desde a antiguidade. É exemplar a observação de Hipócrates (400 A.C.) que eunucos não desenvolviam calvície. Posteriormente, Joseph Plenck, em seu livro “*Doctrina de Morbis Cutaneis*” (Viena, 1776) identificou, nesses casos, a miniaturização dos cabelos e denominou-a como *calvities*, de acordo com a extensão: *universalem* e *partialem*; e de acordo com a causa: *febrisequa*, *puerperarum*, *morborum exantematicorum*, *acrimoniosa*, *phtisicorum*, *a debilitate nervosa*, *fenum*, *hereditaria*, *a vapore mercurii* e *a caufa externa*.⁴ Entretanto, o processo de calvície difuso (que acomete preferencialmente mulheres) causa confusão em sua nomenclatura até os dias de hoje.⁵

Inicialmente, o termo “alopecia difusa na mulher” foi bastante empregado na caracterização da doença.^{6,7} Após a demonstração da participação dos hormônios masculinos no desenvolvimento da calvície de padrão clássico nos homens, em 1942, por Hamilton,⁸ o termo alopecia androgenética estabeleceu-se por enfatizar os elementos hormonais e genéticos associados ao desenvolvimento

do quadro.⁹ Devido ao fato da alopecia de padrão difuso que frequentemente acomete as mulheres ter sido entendida como uma variante da mesma entidade, o termo alopecia androgenética feminina, ou calvície feminina, passou a ser utilizado.⁷

Apesar das alterações foliculares que levam à alopecia serem semelhantes entre os sexos, a apresentação clínica e resposta à terapia antiandrogênica são diferentes. Além disso, a participação dos androgênios no desenvolvimento da calvície feminina ainda não foi completamente elucidada. Considerando essas diferenças em relação a calvície masculina, o termo alopecia androgenética feminina tem sido preterido por alopecia de padrão feminino (APF).⁵ Neste texto adotaremos a termo APF para denominação da calvície na mulher e alopecia de padrão masculino (APM) para denominação da calvície no homem. Apesar dessa divisão, eventualmente a mulher pode apresentar calvície semelhante ao padrão masculino e vice-versa.

APF caracteriza-se como alopecia difusa não cicatricial, evoluída a partir da progressiva miniaturização de folículos pilosos e posterior diminuição do número de fios, principalmente nas regiões central, frontal e parietal do couro cabeludo.(Figura 1).¹⁰

APF é a condição que mais leva à queda de cabelo em mulheres adultas. Sua prevalência aumenta com a idade e apresenta resposta inconstante ao tratamento.¹¹ Esses elementos comprometem a imagem corporal e afetam importantemente a autoestima, impactando na qualidade de vida das pacientes.^{12,13}



Figura 1. Alopecia de padrão feminino. Observa-se rarefação difusa dos cabelos na região frontal e parietal, preservando a linha de implantação anterior.

EPIDEMIOLOGIA

A queixa de queda ou rarefação dos cabelos é frequente na prática dermatológica. Segundo censo realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia em 2006, envolvendo 36253 pacientes do sexo feminino, alopecia não cicatricial (sem especificação) figurou entre os dez diagnósticos mais comuns.¹⁴

A frequência da APF varia entre os diversos grupos populacionais, aumentando em função da idade. Entretanto, a comparação entre os estudos de prevalência é prejudicada pela falta de critérios universalmente aceitos para a sua definição diagnóstica.¹⁰

Em geral, APF se manifesta principalmente durante o menacme. Casos mais graves, são perceptíveis já na puberdade, porém, a faixa etária em que se identifica maior procura por tratamento é entre 25 e 40 anos. Há um segundo pico de incidência na menopausa, entre 50 e 60 anos.^{10,15,16}

Como a doença apresenta curso lento e progressivo, estudos que consideram apenas critérios clínicos identificam principalmente casos com franca diminuição do volume de cabelo e demonstram prevalência modesta entre as jovens. Porém, se utilizados métodos propedêuticos mais sensíveis, como a identificação da miniaturização dos fios à dermatoscopia, provavelmente a prevalência da APF tornar-se-á mais significativa em todas as faixas etárias.¹⁷

Um estudo norte americano, realizado em 2001, que avaliou 1008 mulheres caucasoides, evidenciou prevalência de 3% na terceira década de vida, com aumento gradual até alcançar 32% na nona década, resultando em uma prevalência global de 19%.¹⁸

Em 2001, um estudo inglês, com 377 pacientes, demonstrou prevalência de 6% entre mulheres com menos de 50 anos, atingindo 38%, acima 70 anos.¹⁹

Uma pesquisa australiana, em 2005, envolvendo 717 mulheres, encontrou prevalência de 13% na terceira década de vida, chegando a 54%, na oitava década, com uma prevalência global de 32%.²⁰

Em investigação envolvendo 4601 mulheres coreanas, em 2001, identificou-se prevalência global de 5,6%. Também com frequências progressivamente maiores com a idade.²¹

Da mesma forma, em 2010, um estudo populacional envolvendo 8446 mulheres chinesas encontrou padrão de prevalência semelhante à população coreana.²²

Recente trabalho realizado em Taiwan envolvendo 26226 mulheres evidenciou prevalência global inferior a das caucasoides, porém, mais elevada do que a observada entre as coreanas e chinesas.²³ Além da prevalência, esse estudo buscou identificar possíveis fatores de risco associados a APF. Foi encontrada associação positiva entre índice de massa corporal >26 (OR=1,1), glicemia de jejum >110mg% (OR=1,1), puberdade antes dos 16 anos (OR=1,2), menor (≤ 3) número de partos (OR=1,2), uso de anticoncepcional hormonal oral por período maior que um ano (OR=1,2) e exposição solar por tempo maior que 16 horas por semana (OR: 1,2) com APF. Porém, mulheres que amamentaram (OR=0,9), protegem-se do sol diariamente (OR=0,8) ou tiveram ciclo menstrual com duração menor que 35 dias (OR=0,9), apresentaram menor risco de desenvolver a doença. Esses dados sugerem que maiores exposições ao estrogênio podem correlacionar-se positivamente com APF, sugerindo potencial controle epigenético da APF.²³

Até o momento, não há estudos populacionais sobre a prevalência de APF em mulheres do continente africano e entre brasileiras.

A tabela 1 e a figura 2 sumarizam resultados ponderados de diferentes publicações sobre a prevalência da APF em relação à idade, em caucasoides e asiáticas. Destaca-se a maior frequência entre caucasoides, em todas as idades.

Apesar da maioria das pacientes com APF não apresentarem outros sinais de hiperandrogenismo, a APF é associada a estados hiperandrogênicos, sendo o

mais comum a síndrome dos ovários policísticos (SOP).²⁴ Em estudo realizado na Inglaterra, em 2003, foram avaliadas 89 mulheres com APF e comparadas ao grupo controle. Entre pacientes com APF, 67% apresentaram diagnóstico de SOP, contra 27% do grupo controle.²⁵

Tabela 1. Prevalência da alopecia de padrão feminino dentro de cada faixa etária, apresentado em estudos epidemiológicos realizados em diferentes grupos populacionais.¹⁸⁻²³

Estudo	País	N	Grupos etários*					
			20-29#	30-39#	40-49#	50-59#	60-69#	>69#
Norwood, 2001	EUA	1008	3	17	16	23	25	29
Birch, 2001	Inglaterra	377	3	10	5	14	33	38
Gan, 2005	Austrália	717	12	17	25	28	41	56
Wang, 2010	China	8446	1	2	5	8	10	12
Pai, 2001	Coreia do Sul	4601	-	2	4	7	12	25
Su, 2013	Taiwan	26226	-	6	10	12	13	15

* idade em anos; # percentual de APF aproximado dos pacientes do estudo em cada faixa etária.

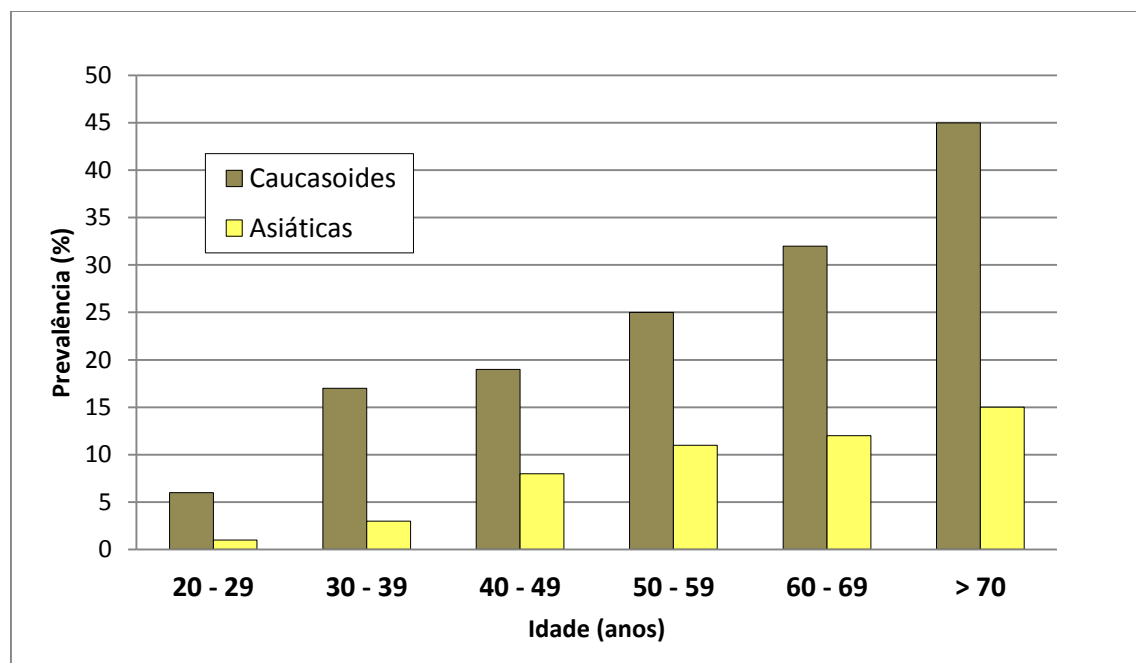


Figura 2. Prevalência de APF em diferentes grupos populacionais (Valores ponderados a partir dos resultados de Norwood, 2001; Birch, 2001; Gan, 2005; Wang TL, 2010; Pai K, 2001 e Su LH, 2012¹⁸⁻²³).

Apesar da APF manifestar-se mais frequentemente na idade adulta, ela pode ocorrer na infância e adolescência. Em 2004, Tosti e colaboradores relataram 20 crianças (sendo 12 do sexo feminino) entre 6 a 10 anos de idade com alopecia androgenética de padrão difuso. Nenhuma delas apresentava alterações laboratoriais, porém, todas apresentavam forte história familiar.²⁶ Em série de casos envolvendo 43 adolescentes (8 do sexo feminino) entre 12 a 18 anos também foi descrito índice elevado de comprometimento familiar. Apenas um indivíduo apresentou alterações hormonais.²⁷

Há indícios de que APF representa um fenótipo associado, independentemente, a resistência à insulina e aterosclerose. O modelo de causalidade para esse achado não está estabelecido, mas pode se relacionar a um estado hiperandrogênico induzido pela resistência à insulina, o que favorece também aterosclerose.²⁸⁻³⁰

Um estudo caso-controle espanhol de 2011 avaliou 240 indivíduos (60 homens e mulheres com calvície e seus 120 controles sem alopecia). Observou-se associação entre calvície de início precoce (<35 anos), hiperglicemia, diabetes e baixos níveis de SHBG. SHBG mostrou-se ainda como preditor independente de hiperglicemia em pacientes com calvície, mesmo após ajuste para circunferência abdominal, sexo e nível de testosterona (OR=3,35). A associação entre baixos níveis de SHBG e hiperglicemia não ocorreu nos controles.³¹

Também com o objetivo de investigar a relação de calvície e síndrome metabólica, foi realizado estudo epidemiológico na população coreana em 2012. Avaliaram-se 1701 mulheres e 1707 homens. As mulheres com síndrome metabólica apresentaram maior prevalência de APF quando comparada as

mulheres sem a disfunção (OR=1,7). Essa relação, porém, não foi observada na população masculina, substanciando que a APF e APM decorram de estímulos diferentes para a miniaturização folicular.³² Por outro lado, em pacientes sem síndrome metabólica, não foi encontrada relação entre APF e resistência à insulina.³³

Foi conduzido um estudo epidemiológico em Taiwan, com 7252 sujeitos de ambos os sexos, em 2013, que evidenciou APF e APM como fatores de risco independentes para mortalidade por doença cardiovascular (HR=2,3) e *diabetes mellitus* (HR=3,0).³⁴

Da mesma forma, em estudo com 51 mulheres com doença arterial coronariana (DAC) e 55 controles que realizaram estudo angiográfico coronariano, em 2005 no Irã, houve associação entre APF com DAC (RR=1,26).³⁵

Em outro estudo caso-controle realizado na Espanha, envolvendo 37 pacientes com APF e 37 controles, evidenciou-se maior prevalência de aterosclerose de carótidas (OR=4,2) e síndrome metabólica (OR=10,7) nos casos em relação aos controles.³⁶

FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da APF não é ainda completamente elucidada. Há evidências de elementos genéticos, hormonais e, possivelmente, ambientais envolvidos.³⁷

O ciclo biológico dos folículos pilosos não é sincronizado entre as unidades adjacentes, assumindo comportamento de mosaico no couro cabeludo. É dividido,

didaticamente, em três fases: anágena (fase de crescimento), catágena (regressão) e telógena (repouso). Ao fim da fase telógena, o fio original desprende-se (fase exógena ou telopsote) sendo repostado por um novo, em fase inicial de crescimento. Normalmente, no couro cabeludo, a fase anágena dura de 2-8 anos; a catágena, 2-3 semanas e a telógena, cerca de 3 meses.³⁸

Dessa forma, em um couro cabeludo adulto normal, há cerca de 80-90% de cabelos em fase anágena, 10-20% em fase telógena e 1-2% em fase catágena. O que pode ser evidenciado pelo exame do tricograma ou pelo estudo anatomopatológico.¹⁷

Na APF ocorre diminuição da duração da fase anágena e miniaturização da papila dérmica (afinamento do fio). Gradualmente, ocorre substituição de fios espessos e pigmentados por fios miniaturizados (Figura 3). Além disso, ocorre atraso entre o fim do telógeno e o início do novo anágeno.³⁹ Essa fase de repouso em que o folículo fica vazio é conhecida como fase quenógena.⁴⁰ Gradativamente, ocorre diminuição da densidade capilar nas áreas acometidas. Apesar das apresentações clínicas com padrões diferentes, essas alterações também ocorrem na APM.

O folículo piloso é uma estrutura complexa em constante atividade, o desbalanço entre diversos fatores de crescimento e citocinas que mantêm a fase anágena e os que promovem apoptose podem determinar o início do catágeno. (Quadro 1).

A apoptose difusa dos queratinócitos foliculares é o fenômeno que leva à regressão folicular que ocorre no catágeno. O término prematuro da fase anágena é evento marcante no desenvolvimento da APF.³⁹

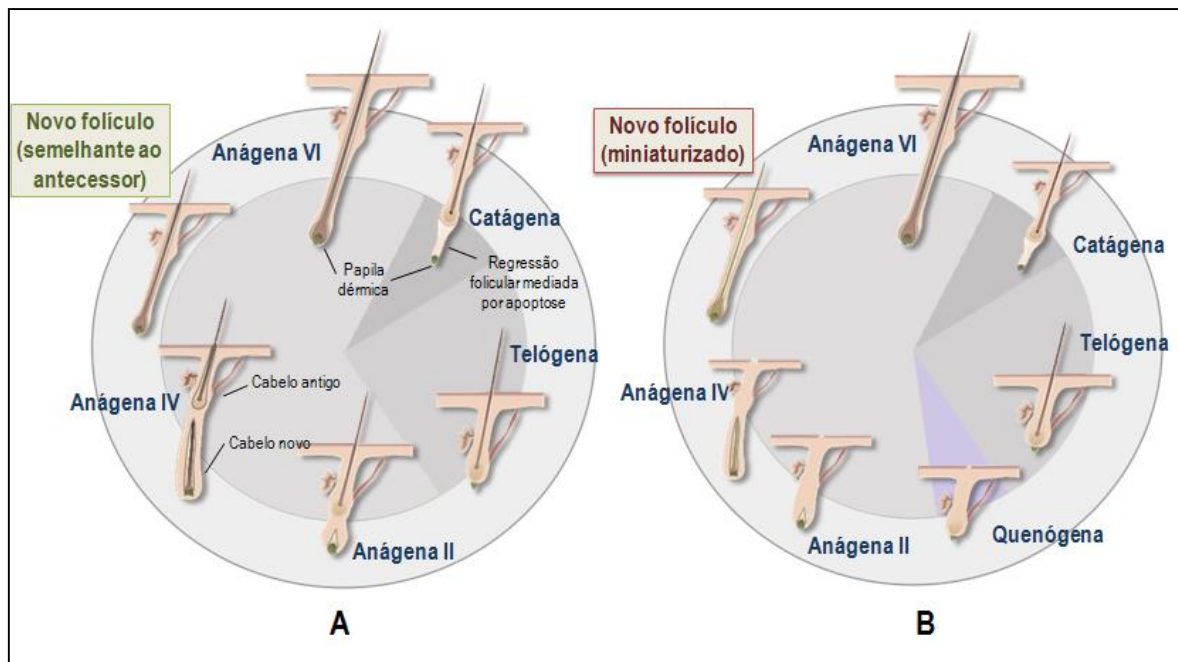


Figura 3. Esquemas representativos do ciclo do pelo. **A** – Ciclo normal do folículo. **B** – Alterações que ocorrem na calvície: encurtamento duração fase anágena, aumento do período de latência (fase quenógena) e miniaturização dos folículos. Essas alterações podem ocorrer de maneira combinada ou isoladas tanto na APF como na APM.

Quadro 1. Principais fatores associados à transição da fase anágena do pelo para a fase catágena.⁴¹⁻⁴⁸

Fatores promotores do anágeno	Fatores promotores da apoptose do folículo
bFGF	FGF5
FGF7	IL-1 α
HGF	PGD ₂
IGF-1	TGF- β 1
PGE ₂	TNF- α
VEGF	
Wnt	

bFGF, fator de crescimento básico de fibroblasto; FGF5, fator de crescimento de fibroblasto 5; FGF7, fator de crescimento de fibroblasto 7; HGF, fator crescimento hepatócitos; IGF-1, fator crescimento semelhante insulina-1; IL-1 α , interleucina 1 alfa; PGD₂, prostaglandina D₂; PGE₂, prostaglandina E₂; TGF- β 1, fator de transformação de crescimento beta 1; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; Wnt, via de sinalização Wnt.

A apoptose pode ser desencadeada de duas maneiras: pela via extrínseca através de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral; ou pela via intrínseca, que pode decorrer da diminuição da adesão entre os queratinócitos, da diminuição de fatores de crescimento, dentre outros sinalizadores.⁴⁹

No folículo piloso, o processo de apoptose inicia-se na área melanogênica (anágeno tardio), propaga-se para matriz (catágeno precoce), para bainha radicular externa e interna.^{50,51}

Apoptose nos diversos locais do folículo piloso apresentam diferentes formas de regulação. Ainda não foi totalmente estabelecido o papel direto das citocinas e fatores de crescimento no controle da apoptose dos queratinócitos foliculares neste processo.^{50,51}

O diâmetro do folículo é determinado diretamente pelo tamanho da papila dérmica.⁵² Portanto, o processo de miniaturização ocorre devido à diminuição do volume da papila. Como o fio mantém a mesma espessura desde a ponta até sua porção proximal, conclui-se que não ocorre afinamento durante a fase anágena. Dessa forma, compreende-se que a miniaturização ocorra em algum momento entre o catágeno e formação do novo fio.^{53,54} Os fatores que levam diretamente à diminuição do volume da papila não são conhecidos e devem se revelar alvos primordiais no desenvolvimento de tratamentos e estratégias de prevenção da APF.

O fio miniaturizado assemelha-se muito ao fio velo, porém não é um velo verdadeiro. Apesar de fino, apresenta músculo piloerector desenvolvido, diferentemente do velo que apresenta músculo diminuído ao ausente.

Um possível mecanismo de miniaturização do folículo é a diminuição do número de células da papila por apoptose.⁵⁵ Apesar da apoptose poder ser induzida nos fibroblastos da papila em situações experimentais,⁵⁶ a papila é o único componente do folículo que expressa permanentemente elevados níveis da proteína antiapoptótica bcl-2, o que, em teoria, conferiria resistência aos estímulos proapoptóticos.^{50,51,55} A falência dos mecanismos antiapoptóticos deve ser investigada como elemento fundamental da fisiopatologia da APF.

Apesar da importância dos fatores hormonais para desenvolvimento da calvície, os mecanismos de ação pelos quais eles levam ao encurtamento da fase anágena e a miniaturização do folículo ainda não foram elucidados.

FATORES HORMONAIS

A dependência dos andrógenos para desenvolvimento da calvície em homens foi observada por Hipócrates (400 A.C.) e estabelecida por Hamilton em 1942. Observou-se que eunucos e homens castrados antes de atingir a adolescência não desenvolviam calvície. Porém, a administração de testosterona (T) induziu surgimento de alopecia nos indivíduos com história familiar de calvície.⁸ Essas observações em conjunto indicavam que a T, ou algum de seus metabólitos, estavam envolvidas no desenvolvimento da APM em indivíduos com predisposição genética.

Os androgênios difundem-se pela membrana citoplasmática e se ligam a receptores intracelulares específicos. Esse complexo hormônio-receptor promove

a transcrição de genes que são os principais responsáveis pelas suas ações teciduais.⁵⁷

A observação de que homens com deficiência genética de 5 α -reductase (5 α R) tipo 2 não desenvolviam calvície sugeriu a diidrotestosterona (DHT) como principal andrógeno envolvido no desenvolvimento da APM.⁵⁸

A 5 α R é enzima que converte a T no metabólito DHT. Existem dois tipos de 5 α R, tipo 1 e 2. A 5 α R tipo 1 está presente nas glândulas sebáceas, e a tipo 2, no trato genitourinário e folículos pilosos.⁵⁹

A miniaturização do folículo piloso por ação dos androgênios ocorre principalmente pela ação da DHT, que apresenta afinidade cinco vezes maior pelo receptor de androgênio (RA) do que a testosterona.⁵⁹ O androgênio ligado ao RA leva a transcrição dos genes responsáveis pela sua ação biológica nas células alvo (Figura 4).

Além disso, a DHT pode interferir no ciclo folicular através de interação com a via de sinalização Wnt. A via Wnt induz as células da papila dérmica a manter a fase anágena.⁴⁵ A adição de DHT suprimiu o crescimento, mediado pela Wnt3a, de queratinócitos em cultura com células derivadas da papila dérmica de paciente com calvície.⁶⁰ A interação dessas vias pode ser importante alvo para terapêutica da calvície. Recente ensaio clínico fase I mostrou melhora da densidade e espessura dos fios em homens com APM com infiltração de complexo contendo atividade Wnt.⁶¹

Embora as evidências que indicam os androgênios na participação da calvície terem surgido de estudos em homens, presumiu-se o seu papel também

na mulher, devido à idéia de que apesar das diferenças clínicas, a calvície no homem e mulher tratava-se da mesma entidade.

O bloqueio da 5 α R tipo 2 mostrou-se eficaz no tratamento da APM, corroborando a importância da DHT na sua fisiopatologia. Porém, para tratamento da APF, finasterida e dutasterida mostraram resultados menos consistentes mesmo quando utilizada em doses mais elevadas.⁶²⁻⁶⁸

A aromatase é a enzima que converte androstenediona em estrona e testosterona em estradiol, exercendo ação antiandrogênica. Em estudo realizado por Sawaya em 1997, envolvendo 12 homens e 12 mulheres com calvície, os folículos da região frontal de mulheres com APF apresentaram metade dos níveis de aromatase dos folículos da região occipital. E quando comparados com os folículos da regiões frontal dos homens, apresentaram níveis seis vezes maiores.⁶⁹ Esses dados sugerem que a aromatase pode apresentar ação protetora contra a calvície ao converter androgênios em estrogênios.

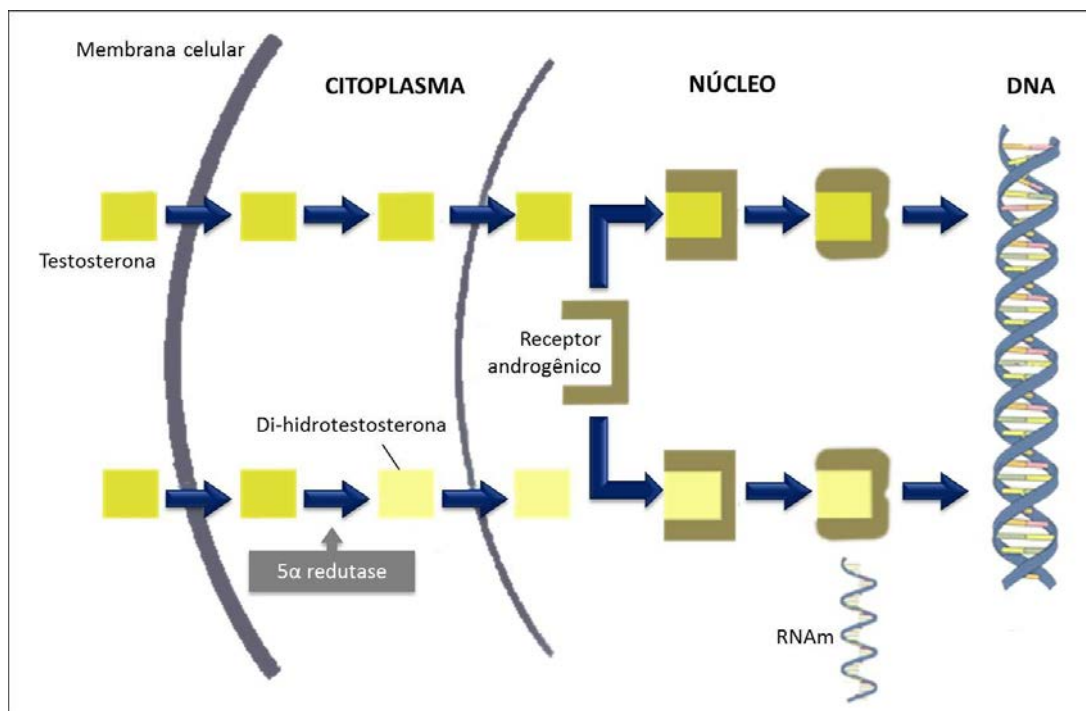


Figura 4. Esquema representativo da ação celular de androgênios. A testosterona (T) entra na célula e é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α-redutase (5α-R). Tanto a T como a DHT ligam-se aos receptores de androgênio para promover as alterações na transcrição do DNA celular (Adaptado de Randall, 2008⁵⁷).

MICROINFLAMAÇÃO

O processo de miniaturização na calvície pode ser acompanhado por um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário leve a moderado na região peri-infundibular. Para diferenciá-lo da franca inflamação que ocorre nas alopecias cicatriciais, o termo microinflamação tem sido utilizado.^{70,71}

A frequência deste processo é variável. Em 1993, Whiting avaliou a presença do infiltrado inflamatório em 106 homens com APM e 22 controles (13 homens e 9 mulheres). Infiltrado inflamatório leve foi encontrado em cerca de 30% dos casos e controles. Porém, infiltrado inflamatório moderado foi encontrado em 36% dos casos contra apenas 9,1% dos controles.⁷²

O fato do processo inflamatório ocorrer na parte alta do folículo sugere que o fator causal pode incidir nessa região. Fatores externos como radiação ultravioleta, poluentes ambientais, habitantes da microbiota da pele e do folículo como *Propionibacterium sp.*; *Staphylococcus sp.*; *Malassezia sp.*, dentre outros, poderiam estar envolvidos na indução do processo de microinflamação.⁷⁰

O real valor desse processo inflamatório para evolução da APF, assim como a sua possível relação com o processo de miniaturização e os elementos hormonais envolvidos na APF, ainda não foram estabelecidos.

GENÉTICA

Pacientes com APF comumente referem familiares afetados pela doença (40 a 54%), principalmente nos casos com apresentação clínica mais precoce (<40 anos).²¹ Estudo comparativo avaliando calvície em gêmeos do sexo masculino evidenciou grau de concordância duas vezes maior em gêmeos monozigóticos quando comparados a dizigóticos.⁷³

A forma de segregação familiar ainda não é completamente compreendida, contudo, a alta prevalência e o fato da APF manifestar-se com variados graus de intensidade e com início em diferentes idades, sugerem padrão poligênico, de penetrância incompleta.^{74,75} Além disso, a influência familiar no desenvolvimento da calvície pode variar entre homens e mulheres e de acordo com a forma de apresentação (clássica ou difusa).⁷⁶

Apesar da importância da DHT no desenvolvimento da APM, não foi encontrada relação dos genes SRD5A1 e SRD5A2 (responsáveis pela produção das enzimas 5 α -redutase 1 e 2) com o desenvolvimento de calvície.⁷⁷

A maior evidência da participação genética no desenvolvimento da calvície decorre de estudos envolvendo o gene AR em homens. Um polimorfismo de nucleotídeo único no primeiro exon, conhecido como STUL, foi associado à calvície. Apesar dessa alteração ser encontrada em 98% dos homens com calvície precoce e 92% dos com calvície tardia, ela também foi encontrada em 77% dos homens sem calvície.⁷⁸⁻⁸⁰

Esses elementos sugerem que outras alterações sejam necessárias para desenvolvimento da APM, o que corrobora a hipótese de origem poligênica e de controle epigenético dessa entidade, como alterações hormonais, medicamentos e estímulos ambientais.

O número de repetições CAG no primeiro exon do gene AR varia entre os indivíduos. Observou-se relação inversa entre número de repetições CAG em sua porção amino-terminal e ativação do AR. Isso incorre em que portadores de repetições mais curtas apresentem maior risco de calvície.⁷⁵

Entretanto, como o gene AR é localizado no cromossomo X, não justifica a concordância de fenótipos entre pais e filhos do sexo masculino. Dessa forma, ou ocorre transmissão materna direta, ou haja herança poligênica (autossômica), ou hipotetiza-se que, além deste gene, outros elementos ambientais estejam envolvidos no desenvolvimento da calvície.

A participação do gene AR na fisiopatologia da APF apresenta menos evidências que na APM. Não foi encontrada relação da presença do fragmento de restrição STUL em APF.⁸¹ Porém, assim como nos homens, o número de

repetições CAG no primeiro exon do gene AR correlacionou-se de maneira inversa à APF.^{82,83} Essa observação permitiu desenvolvimento de teste genético em que detecção de pequeno número de repetições CAG associa-se a maior risco de desenvolvimento de APF, enquanto maior número de repetições associa-se a menor risco. (<http://www.hairdx.com>)

Foi identificado polimorfismo de nucleotídeo único não funcionante (rs4646) no gene que codifica a aromatase (CYP19A1), em mulheres com APF, principalmente nas mais jovens.⁸⁴

Uma metanálise de sete estudos de associação genômica ampla identificou seis *loci* de suscetibilidade associados à APM: 1p36.22, 2q37.3, 7p21.1, 7q11.22, 17q21.31 e 18q21.1.⁸⁵ Porém, em estudo realizado por Redler em 2013, envolvendo 405 mulheres com calvície e 469 controles, não foi demonstrada associação desses *loci* com APF.⁸⁶

Além disso, quatro novos *loci* associados a APM (2q35, 3q25.1, 5q33.3 e 12p12.1) não apresentaram relação com APF em estudo subsequente.^{87,88} Esses dados, em conjunto, sugerem que a APM e APF devam apresentar fatores etiopatogênicos distintos.

Além da genética, possivelmente fatores externos também são importantes para desenvolvimento da APF. Um estudo norte-americano de 2012, envolvendo amplo questionário em 98 gêmeas idênticas, levantou diversos fatores ambientais possivelmente relacionados à APF. Dentre eles destacaram-se: níveis de testosterona, estresse psicológico, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, tabagismo, múltiplos casamentos, falha na fotoproteção, maior renda e pouca atividade física.⁸⁹ Porém, o real papel desses fatores no modelo causal da APF ainda precisa ser determinado.

APRESENTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO

A redução da espessura e a diminuição da densidade de fios leva à redução do volume global do cabelo (espessura média dos fios x número fios).^{19,78}

Esse fenômeno pode ser percebido pela paciente de várias maneiras. Ao dividir o cabelo ao meio, a linha de divisão fica mais evidente (sinal da risca); e ao prender o cabelo (rabo-de-cavalo), o prendedor fica mais solto ou é necessário dar mais voltas no elástico utilizado.¹⁷ Conforme evolução do quadro, o couro cabeludo torna-se mais evidente, podendo ficar totalmente aparente nos casos mais avançados.

Clinicamente, APF pode se apresentar de 3 maneiras:⁹⁰

- 1- Rarefação difusa da região biparietal superior e vértice preservando a linha de implantação anterior. Esse padrão pode ser classificado utilizando-se duas escalas. A de Ludwig,⁷ divide em três graus, em que o primeiro apresenta uma leve rarefação até o terceiro em que ocorre ausência total dos fios na área acometida (Figura 5). Apesar de amplamente utilizada, essa escala apresenta limitações por impossibilitar classificação mais precisa de estágios intermediários. Além disso, não constitui boa ferramenta para avaliação terapêutica, pois o tratamento – mesmo o transplante folicular – dificilmente consegue regredir uma etapa completa na classificação. A classificação de Sinclair é semelhante, porém subdivide a doença em quatro graus de intensidade, a partir do couro cabeludo normal, o que a torna mais ajustável à realidade de cada paciente (Figura 6).⁹¹

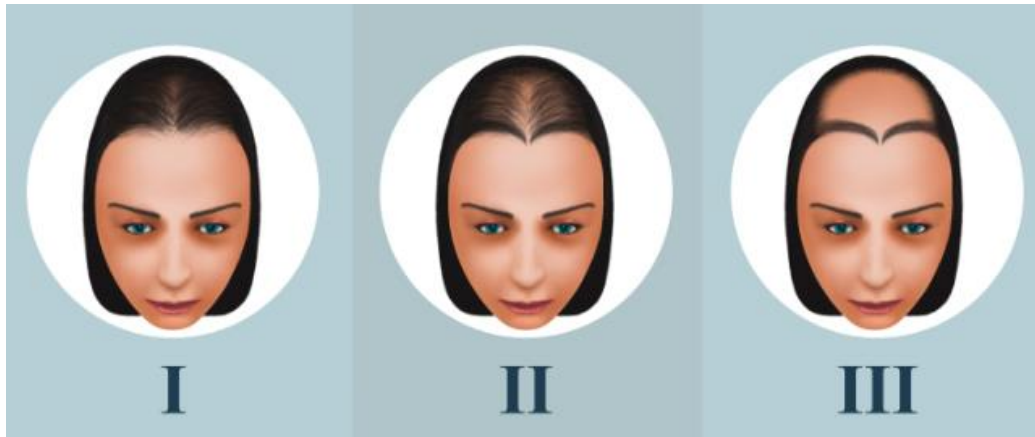


Figura 5. Classificação de Ludwig. Primeira classificação criada para APM. Divisão em três graus de intensidade (Adaptado de Ludwig, 1977⁷).

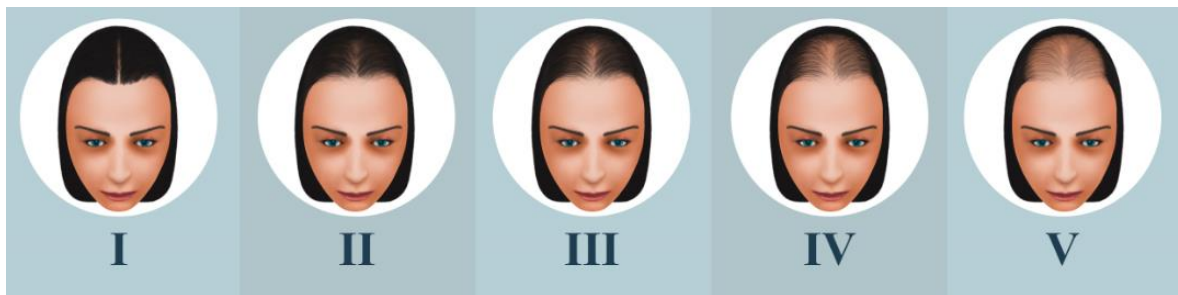


Figura 6. Classificação de Sinclair. Divide APM em quatro graus de intensidade a partir do couro cabeludo normal, à esquerda (Adaptado de Sinclair, 2005⁹¹).

2- Rarefação da região bitemporal superior e vértice com acentuação frontal (padrão árvore de natal). Nesse padrão descrito por Olsen em 1999,⁹² além do processo de rarefação difuso, há uma acentuação na linha central, abrindo-se em forma de triângulo com a sua base na linha de implantação anterior (Figura 7).

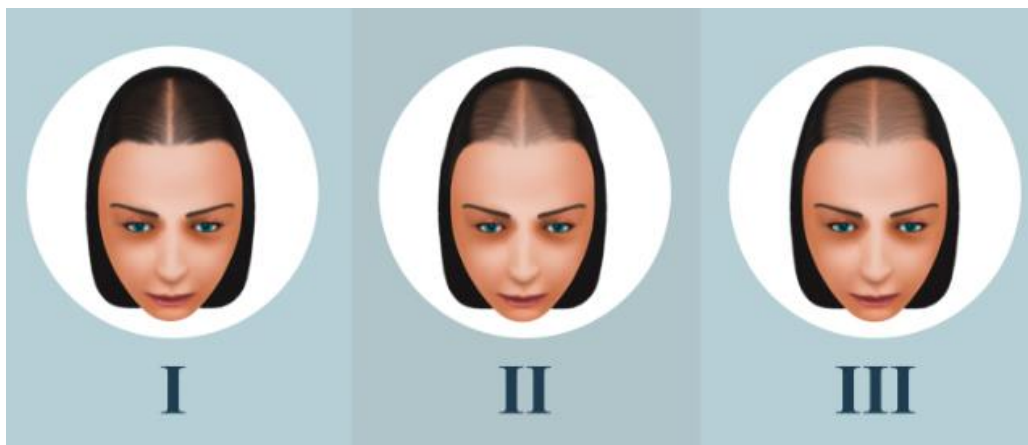


Figura 7. Classificação de Olsen. Além da rarefação difusa ocorre uma acentuação na região frontal que se abre em direção linha de implantação anterior formando aspecto de “árvore de Natal” (Adaptado de Olsen, 2003^{10,93})

3- Rarefação com recesso bitemporal (Figura 8). A apresentação clínica dita clássica. Proposta por Hamilton em 1951 e modificada por Norwood em 1975.^{9,94} Utilizada principalmente para classificação da calvície masculina, entretanto, raramente, esse padrão pode ocorrer nas mulheres.

Recentemente, uma nova classificação conhecida como BASP (*basic and specific*) foi elaborada por Lee em 2011, com a finalidade de uma escala unificada, de fácil memorização e aplicabilidade, para ser utilizada nos diversos tipos de apresentação da calvície tanto em homens como em mulheres.⁹⁵⁻⁹⁷

As formas básicas são representadas pelo formato da linha de implantação capilar anterior (L, M C e U). As características específicas referem-se à densidade do cabelo em áreas distintas (frontal e vértex). A classificação final depende da combinação das formas básicas e específicas (Figura 9).⁹⁷

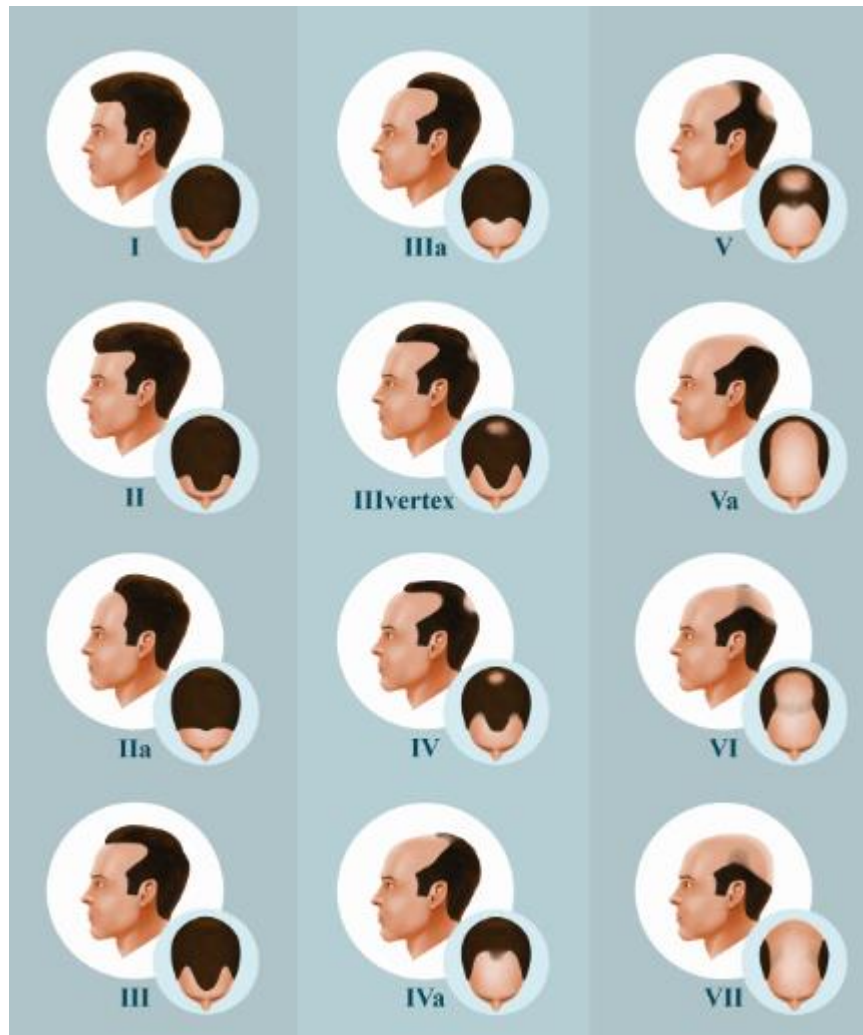


Figura 8. Classificação de Hamilton-Norwood. Criada para classificação da APM. Padrão que raramente acomete mulheres. (Adaptado de Norwood, 1975⁹)

Ao exame físico, o teste de tração (manobra de Sabouraud) pode revelar um aumento na liberação dos telógenos. A quantidade de fios que irão se soltar, depende da quantidade tracionada. Considerando que entre 10 a 20% dos cabelos estão na fase telógena e muitos deles ainda se encontram firmemente aderidos ao saco epitelial, espera-se que possa ocorrer desprendimento de até 10% dos fios tracionados.¹⁷

Quando o teste está positivo na APF, ele restringe-se às áreas de acometimento da doença. Teste difusamente positivo indica eflúvio telógeno ou

alopecia areata difusa.⁹⁶ A presença de fios telógenos, menores do que três centímetros, representam a fase telógena dos folículos miniaturizados, e são bastante sugestivas do diagnóstico de APF.¹⁵ O teste apresenta grande variabilidade inter-examinador e dificuldade de padronização. A lavagem do cabelo recente com despreendimento de fios telógenos pode influenciar no resultado do exame.

Usualmente, APF não se acompanha de sintomatologia sistêmica ou achados clínicos que ultrapassem o couro cabeludo.

Clinicamente, as formas iniciais de APF ou de rarefação difusa podem infligir dificuldade ao diagnóstico com outras formas de alopecia difusa não cicatricial como o eflúvio telógeno crônico, alopecia senil, alopecia areata difusa alopecia areata incógnita, síndrome dos cabelos anágenos frouxos e alopecia sifilítica.⁹⁸⁻¹⁰⁹

A sobreposição entre os diagnósticos ocorre com certa frequência, eventualmente, revelando quadros de APF iniciais. Técnicas semiológicas suplementares como tricograma, dermatoscopia, trichoscan® e o exame histopatológico subsidiam o diagnóstico da APF nesses casos.



Figura 9. O tipo básico (BA) é definido pela forma da linha de implantação anterior. Existem 4 tipos que são designados por letras. *Tipo L*, não apresenta nenhum recesso na linha anterior, padrão linear. *Tipo M* apresenta recesso frontotemporal bilateral mais proeminente que o central.

Formato lembra letra M. *Tipo C*, o recesso central é mais proeminente que o frontotemporal, formato da letra C. Os tipos M e C são subdivididos em 4 grupos dependendo da intensidade. No tipo U a linha anterior está posterior ao vertex, lembrando formato de uma ferradura ou da letra U.

O *Tipo U* é subdividido em 3 grupos dependendo da posição em que a linha de implantação encontra-se entre o vertex e a protuberância occipital. O tipo específico (SP) representa a densidade capilar em determinadas áreas. O *tipo F* (frontal) refere-se a diminuição de densidade em toda a área superior do couro cabeludo, menos a linha anterior. O *tipo V* representa rarefação na região do vertex. Os tipos específicos são subdivididos em 3 grupos conforme a intensidade. Quando o paciente apresentar características dos dois tipos (F e V), ambos devem ser descritos.

O tipo final resultará da combinação dos tipos básico e específico. (Adaptado de Lee, 2011⁹⁵)

TRICOGRAMA

O tricograma consiste na análise, em microscópio de luz, de uma amostra de fios extraída do couro cabeludo, e geralmente, a amostra contém entre 50 a 100 fios.

O exame permite avaliação da quantidade de fios que se encontram em cada fase do ciclo (anágeno, catágeno ou telógeno), indicado principalmente quando há suspeita de eflúvio anágeno ou síndrome dos anágenos frouxos. Deve ser realizado apenas por dermatologistas treinados e que realizam exame frequentemente.^{16,90}

DERMATOSCOPIA

A dermatoscopia é exame não invasivo, de fácil execução, que pode contribuir para o diagnóstico da APF, principalmente nas fases iniciais.¹¹⁰⁻¹¹²

O principal achado dermatoscópico é a diversidade da espessura dos fios com aumento do número de fios miniaturizados (Figura 10), especialmente na região frontoparietal.¹¹⁰ Em estudo realizado com 34 pacientes com APF em 2012, essas alterações foram encontradas em todas as pacientes estudadas.¹¹³ A observação isolada de mais de 10% de fios finos é altamente sugestiva do diagnóstico.¹¹⁴

A diminuição do número de fios por unidade folicular é outro elemento importante. Normalmente os fios emergem do óstio folicular em grupos de 2 a 4, em sua maioria. Na APF esse número diminui para 1 ou 2 fios (Figura 10).

O sinal peripilar constituído de área marrom clara, discretamente atrófica ao redor do folículo, geralmente ocorre nos estágios iniciais da APF. Esse sinal apresenta correlação com o infiltrado inflamatório observado ao exame anatomopatológico.¹¹⁵

Pontos amarelos podem ser vistos nos casos mais avançados, provavelmente como consequência do acúmulo de sebo e queratina em folículos dilatados.¹¹⁴ Conforme aumenta a rarefação dos cabelos, há maior penetração da radiação ultravioleta no couro cabeludo, podendo ocorrer alterações típicas do fotoenvelhecimento, como a formação de rede pigmentada em favo de mel.



Figura 10. Dermatoscopia do couro cabeludo. **A)** APF. Observa-se grande variabilidade nas espessura das hastes, fios emergindo isoladamente do óstio folicular, densidade de folículos reduzida (achado tardio) e rede pigmentar incipiente entre os folículos. **B)** Normal. Uniformidade na espessura dos fios e vários fios emergindo do mesmo óstio.

Esses sinais quando avaliados em conjunto permitem o diagnóstico de APF precocemente, antes da ocorrência de diminuição significativa do volume de cabelos. Em 2009, Rakowska padronizou critérios (Quadro 2) com base nos achados dermatoscópicos para diagnóstico de APF.

Quadro 2. Critérios dermatoscópicos para o diagnóstico da APF. Dois critérios maiores ou um critério maior e dois menores apontam diagnóstico com 98% de especificidade.¹¹⁴

<u>Critérios maiores</u>	1 - Mais de 4 pontos amarelos em 4 áreas na região frontal (aumento de 70x) 2 - Diminuição da espessura média dos fios da região frontal comparada com occipital (avaliação de pelo menos 50 fios em cada área) 3 - Mais de 10% de fios finos (<0,03 mm) na região frontal
<u>Critérios menores</u>	1 - Relação de fios isolados por unidade folicular da área frontal com a occipital > 2:1 2 - Relação do número de fios finos da área frontal com a occipital > 1,5:1 3 - Relação de folículos com hiperpigmentação perifolicular da área frontal com a occipital > 3:1

TRICHOSCAN®

O TrichosScan® é um sistema que combina microscopia epiluminescente e análise automatizada de imagens digitais. Permite a estimativa do número e densidade de fios, porcentagem de fios terminais e velus e, por aproximação matemática, a porcentagem de fios na fase anágena e telógena.^{116,117}

Para realização do exame, uma área de aproximadamente 1 cm² no couro cabeludo é raspada e avaliada após 48 a 72 horas. O software realiza análise automática da imagem capturada pela câmera. Determina-se o número total de fios na área, densidade de fios por cm², porcentagem de fios terminais (espessura maior que 40 µm) e velus (espessura menor que 40 µm).

Os fios anágenos, ao contrário dos telógenos, estão em processo contínuo de crescimento. Como as imagens são analisadas 72 horas após a raspagem, pelo comprimento do fio, pode-se diferenciar os cabelos que apresentaram crescimento daqueles que não. Os cabelos que cresceram são classificados como anágenos e os que não cresceram são classificados como telógenos.

TrichosScan® pode ser utilizado como ferramenta para auxílio diagnóstico e no seguimento dos pacientes em tratamento. Para garantir reprodutibilidade nas avaliação subsequentes, recomenda-se tatuar a área a ser avaliada.

ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

A APF não está associada a alterações laboratoriais características. A investigação de causas de eflúvio telógeno pode beneficiar a resposta terapêutica em pacientes com as condições concomitantes.

A relação de possíveis alterações nos níveis de ferritina e APF é controversa. Alguns estudos demonstraram menor valor de ferritina em pacientes com APF quando comparada a controles e melhor resposta à terapia antiandrogênica em pacientes com ferritina maior que 40 µg/l.^{118,119}

Entretanto, em revisão realizada por Trost e colaboradores em 2006, concluiu-se que não há evidências para dosagem rotineira de ferritina em investigação de queda de cabelo, assim como também não há evidência para suplementação de ferro em pacientes sem anemia. A decisão sobre investigação laboratorial e suplementação fica a critério individual.¹²⁰

Nessa mesma revisão o autor afirma que, apesar da falta de evidência, realiza avaliação laboratorial rotineira e trata as pacientes com deficiência de ferro independentemente de apresentarem anemia. Justifica essa conduta por percepção pessoal de melhor resposta terapêutica quando pacientes apresentam ferritina acima de 70 µg/ml.¹²⁰

A maioria das mulheres com APF não apresentam hiperandrogenismo. A presença de outros sinais e sintomas indicativos de hiperandrogenismo, como alterações do ciclo menstrual, infertilidade, hipertrofia clitoriana, alteração da libido, hirsutismo, acne, oleosidade da pele e alteração do timbre de voz devem ser avaliados clinicamente e constituem sinal de alerta.¹²¹

O consenso europeu realizado em 2011 orienta determinação do índice de androgênio livre (FAI) e dosagem de prolactina como exames de triagem. O FAI é a relação entre testosterona total e a globulina de ligação a hormônio sexual (SHBG) $[\text{Testosterona total (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)} \times 100]$. Dependendo dos resultados e contexto clínico, avaliação endocrinológica complementar pode ser realizada. FAI de 5 ou mais é indicativo de síndrome de ovários policísticos. O uso de contraceptivos hormonais alteram os níveis de SHBG, portanto a investigação laboratorial só deve ser realizada após pausa da contracepção hormonal de no mínimo 2 meses.⁹⁰

Da mesma maneira, a dosagem de TSH deve ser realizada, pois alterações tireoidianas podem contribuir com eflúvio associado à APF.¹²²

A importância da vitamina D, além do metabolismo do cálcio, vem sendo muito debatida nos últimos anos. Um estudo recente, envolvendo 80 pacientes do sexo feminino com eflúvio telógeno ou APF e 40 controles, evidenciou níveis mais baixos de vitamina D nos casos que nos controles.¹²³ Porém, seu papel no ciclo do pelo e no desenvolvimento de alopecias ainda precisa ser estabelecido.^{124,125}

ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

Na maioria das vezes o diagnóstico da APF pode ser estabelecido apenas por elementos clínicos. Casos muito iniciais, apresentações atípicas e possível concomitância com outras alopecias, podem necessitar do exame anatomopatológico para sua definição.

A análise tradicional em cortes longitudinais permite visualização de todo o folículo, o que é fundamental para avaliação de alopecias que cursam com infiltrado liquenoide, alterações interface e de subcutâneo.⁷¹ Porém, o corte longitudinal permite avaliar apenas pequeno número de folículos da amostra, impossibilitando a análise quantitativa dos folículos, que é fundamental para diagnóstico de APF.

A análise dos folículos pelo corte transversal, padronizada por Whiting em 1993, permite a avaliação comparativa entre todos os folículos da amostra e constitui o método padrão para avaliação histológica de pacientes com suspeita de APF.⁷²

Portanto, idealmente deve-se realizar biópsia em 2 pontos com punch de 4 milímetros para permitir tanto o corte transversal quanto o horizontal.⁷¹

A principal alteração encontrada no corte horizontal é aumento da proporção de fios miniaturizados em relação a fios terminais (Figura 11).

Conceitualmente, fios terminais apresentam diâmetro maior do que 0,03 mm e são mais espessos que a sua bainha radicular interna. Fios velus e miniaturizados apresentam diâmetro menor que 0,03 mm e são menos espessos que a bainha radicular interna. A diferenciação entre fio velo primário e fio

miniaturizado pode ser feita pela observação da bainha radicular externa mais estruturada e musculo piloerector desenvolvido no fio miniaturizado.

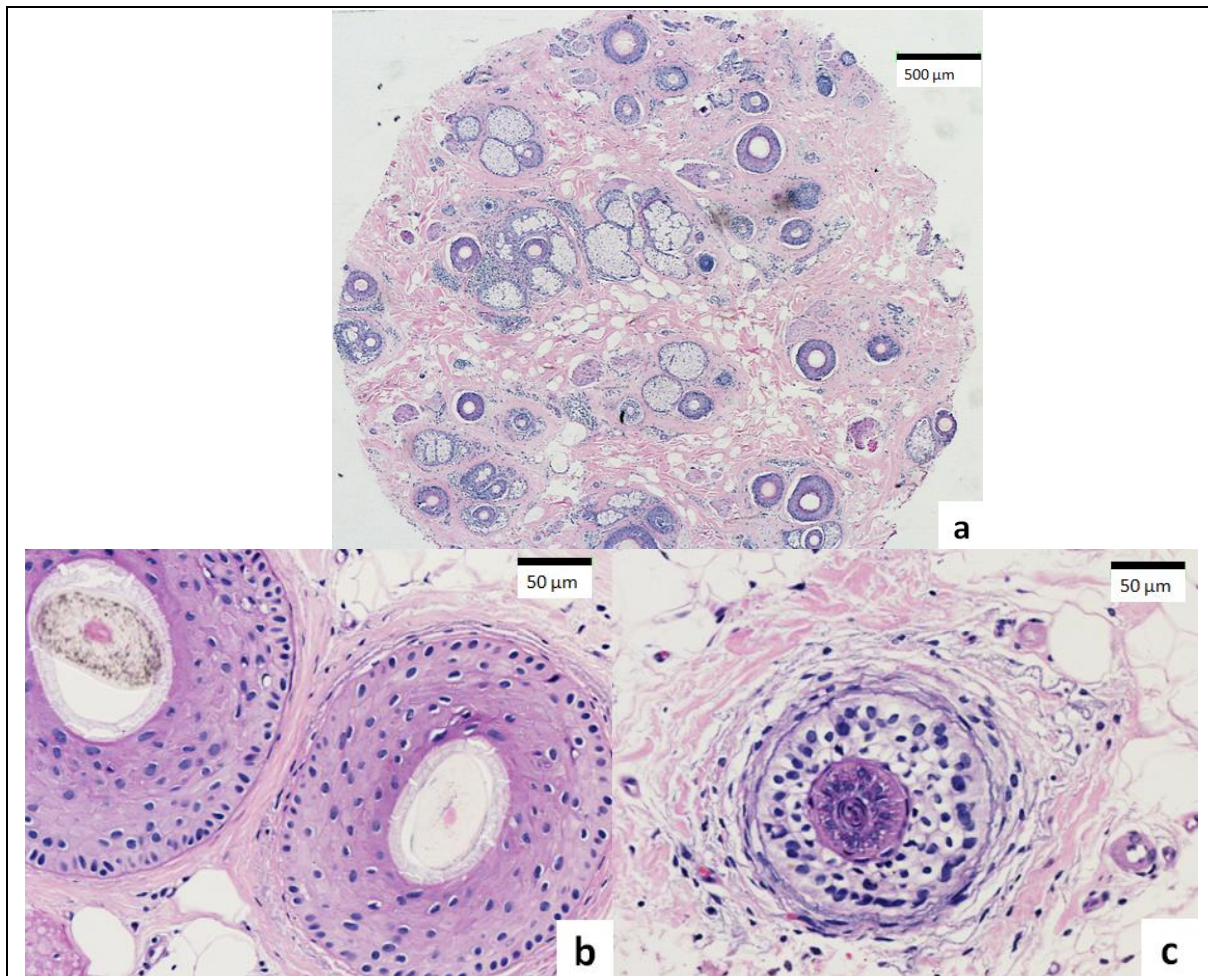


Figura 11. Exame histopatológico de APF. **a)** Corte transversal evidenciando grande variabilidade no diâmetro dos folículos. **b)** detalhe folículo terminal **c)** detalhe de folículo miniaturizado, fibrose perifolicular e infiltrado inflamatório mononuclear esparso. (HE 40x)

Há redução da razão anágeno/telógeno e, em casos avançados, redução da densidade folicular. Ocorre ainda discreto infiltrado inflamatório linfohistiocitário perifolicular e fibrose, que estão associados a pior prognóstico.^{72,126}

Nos cortes verticais, uma faixa característica de tecido conectivo residual pode ser vista na profundidade da derme sob os folículos miniaturizados.¹⁰⁶

QUALIDADE DE VIDA

Apesar dos cabelos não exercerem uma função biológica vital, apresentam grande importância relacionada à aparência, à autoestima e função de identidade social.¹³

A gravidade da alopecia, estabelecida pelo dermatologista através dos sistemas de classificação, não prediz a percepção da paciente sobre a gravidade do seu caso nem a intensidade do comprometimento da qualidade de vida.¹² Portanto, o dermatologista deve estar atento aos componentes emocionais e deve utilizar ferramentas específicas para avaliar o impacto da APF na qualidade de vida dos pacientes.

A representação do cabelo saudável na vida da mulher implica em sentimentos de autoestima, mutabilidade e interação social. Em estudo brasileiro de 2012, o temor relacionado a perder todos os cabelos era tão grande quanto o de se desenvolver um infarto do miocárdio.¹²⁷

Apesar da existência de diversos questionários genéricos para avaliação da qualidade de vida, eles nem sempre contemplam de maneira adequada todos os domínios de enfermidades específicas. Em 2000, Dolte e colaboradores desenvolveram e validaram um questionário específico para avaliação da qualidade de vida em pacientes com APF, o “*Women's Androgenetic Alopecia Quality of Life Questionnaire*” (WAA-QOL).¹²⁸

Ainda que o questionário tenha demonstrado um excelente desempenho psicométrico, WAA-QOL é pouco utilizado em pesquisa clínica, também não foi ainda traduzido e adaptado culturalmente para a língua portuguesa do Brasil. Porém, revela-se um instrumento importante tanto para avaliação do impacto da

APF na qualidade de vida das pacientes, individualmente, como para avaliação da resposta terapêutica em ensaios clínicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da alta prevalência, o manejo da APF ainda impõe diversas dificuldades ao dermatologista na sua prática clínica.

A sua nomenclatura e definição diagnóstica ainda geram conflitos entre os autores. Os elementos genéticos não são completamente conhecidos. A real participação dos hormônios ainda não é clara.⁵

Apesar das alterações microscópicas entre a APF e APM serem indênticas, em se considerando a diversidade de apresentação clínica e de resposta ao tratamento, não podemos afirmar com certeza que se tratam da mesma entidade com diferentes apresentações entre os sexos.⁵

Apesar do tratamento não fazer parte do escopo deste texto, cabe realçar que a resposta terapêutica da APF é inconstante e menos expressiva que na APM. Mesmo com uso de antiandrogênicos, contraceptivos orais combinados, minoxidil tópico e laser de baixa potência, não há a promoção de recuperação completa, às vezes nem mesmo clinicamente perceptível nas pacientes.^{129,130} O transplante folicular apresenta certas limitações quanto à disponibilidade de área doadora nos casos difusos, e à aquisição de volume capilar na área transplantada, além de não dispensar o tratamento clínico prolongado.¹³¹⁻¹³³

A identificação de pacientes vulneráveis associada ao diagnóstico de formas iniciais da APF, e a introdução precoce da terapêutica, podem promover

melhores resultados clínicos ou mesmo a interrupção da progressão da doença, do que a abordagem de casos mais avançados.

Deve-se salientar que ainda há baixa acurácia na detecção por fotografias clínicas, do relato de pacientes, da dermatoscopia e do TrichoScan® para a avaliação objetiva, longitudinalmente, da alopecia em ensaios clínicos terapêuticos relacionados à APF. A melhora das técnicas semiológicas permitirá diagnóstico mais apurado e maior capacidade de detecção dos desfechos nos ensaios clínicos.¹³⁴

É fundamental avanço no conhecimento da fisiopatologia da APF para elaboração de novas terapêuticas, mais eficazes na prevenção e reversão do quadro. Isso inclui a investigação detalhada de outros elementos potencialmente envolvidos na sua fisiopatogênese além dos genéticos e hormonais.³⁷

Mais do que pormenorizar as minúcias do ciclo do pelo, a elucidação da epidemiologia, genética e fisiopatologia da APF são uma esperança para a melhoria da qualidade de vida das pacientes afligidas pela doença.

AGRADECIMENTOS

Doutora Mayra Ianhez, pela revisão crítica do manuscrito.

Doutoranda Carla Müller Ramos, pela participação fundamental no desenvolvimento das ilustrações.

REFERÊNCIAS

1. Linguagem médica: Alopecia, alopecia. 2011. (Accessed 11/11/2013, at <http://www.jmrezende.com.br/alopecia.htm>.)
2. Busca no vocabulário. Academia Brasileira de Letras, 2009. (Accessed 11/11/2013, at <http://www.academia.org.br/abl/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=23>.)
3. Descritores em ciências da saúde. Biblioteca Virtual em Saúde, 2013. (Accessed 11/11/2013, at <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>.)
4. Plenck JJ. Doctrina de Morbis Cutaneis. Qua hi morbi in suas classes, genera et species redingtur. Vienna: J.F. Van Overbeke; 1776.
5. Sinclair R. Winding the clock back on female androgenetic alopecia. Br J Dermatol 2012;166:1157-8.
6. Sulzberger MB, Witten VH, Kopf AW. Diffuse alopecia in women. Its unexplained apparent increase in incidence. Arch Dermatol 1960;81:556-60.
7. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. Br J Dermatol 1977;97:247-54.
8. Hamilton JB. Male hormone stimulation is prerequisite and an incitant in common baldness. Am J Anat 1942;71:451-80.
9. Norwood OT. Male pattern baldness: classification and incidence. South Med J 1975;68:1359-65.
10. Olsen EA. Female pattern hair loss. J Am Acad Dermatol 2001;45:S70-80.
11. Shapiro J. Clinical practice. Hair loss in women. N Engl J Med 2007;357:1620-30.
12. Reid EE, Haley AC, Borovicka JH, et al. Clinical severity does not reliably predict quality of life in women with alopecia areata, telogen effluvium, or androgenic alopecia. J Am Acad Dermatol 2012;66:e97-102.
13. Schmitt JV, Ribeiro CF, Souza FH, Siqueira EB, Bebbler FR. Hair loss perception and symptoms of depression in female outpatients attending a general dermatology clinic. An Bras Dermatol 2012;87:412-7.
14. Sociedade Brasileira de Dermatologia SBD. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. An Bras Dermatol 2006;81:545-54.
15. Tosti A, Piraccini BM. Androgenetic alopecia. In: Tosti A, Piraccini BM, eds. Diagnosis and treatment of hair disorders: An evidence based atlas London: Taylor and Francis; 2006:45-56.
16. Pereira JM. Propedêutica das doenças dos cabelos e do couro cabeludo. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.
17. Pereira JM. Alopecia Androgenética (Calvície) na Mulher. 2 ed. São Paulo: Di Livros; 2007.
18. Norwood OT. Incidence of female androgenetic alopecia (female pattern alopecia). Dermatol Surg 2001;27:53-4.
19. Birch MP, Messenger JF, Messenger AG. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. Br J Dermatol 2001;144:297-304.
20. Gan DC, Sinclair RD. Prevalence of male and female pattern hair loss in Maryborough. J Investig Dermatol Symp Proc 2005;10:184-9.
21. Paik JH, Yoon JB, Sim WY, Kim BS, Kim NI. The prevalence and types of androgenetic alopecia in Korean men and women. Br J Dermatol 2001;145:95-9.
22. Wang TL, Zhou C, Shen YW, et al. Prevalence of androgenetic alopecia in China: a community-based study in six cities. Br J Dermatol 2010;162:843-7.
23. Su LH, Chen LS, Chen HH. Factors associated with female pattern hair loss and its prevalence in Taiwanese women: a community-based survey. J Am Acad Dermatol 2013;69:e69-77.
24. Lee AT, Zane LT. Dermatologic manifestations of polycystic ovary syndrome. Am J Clin Dermatol 2007;8:201-19.
25. Cela E, Robertson C, Rush K, et al. Prevalence of polycystic ovaries in women with androgenic alopecia. Eur J Endocrinol 2003;149:439-42.
26. Tosti A, Pazzaglia M, Soli M, et al. Evaluation of sexual function with an international index of erectile function in subjects taking finasteride for androgenetic alopecia. Arch Dermatol 2004;140:857-8.
27. Kim BJ, Kim JY, Eun HC, Kwon OS, Kim MN, Ro BI. Androgenetic alopecia in adolescents: a report of 43 cases. J Dermatol 2006;33:696-9.
28. Madhani N, Khan K, Chauhan P, Parmar G. Polycystic ovarian syndrome. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2013;79:310-21.
29. Dalamaga M, Papadavid E, Basios G, et al. Ovarian SAHA syndrome is associated with a more insulin-resistant profile and represents an independent risk factor for glucose abnormalities in women with polycystic ovary syndrome: A prospective controlled study. J Am Acad Dermatol 2013;69:922-30.
30. Ding EL, Song Y, Manson JE, et al. Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men. N Engl J Med 2009;361:1152-63.

31. Arias-Santiago S, Gutierrez-Salmeron MT, Buendia-Eisman A, Giron-Prieto MS, Naranjo-Sintes R. Sex hormone-binding globulin and risk of hyperglycemia in patients with androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:48-53.
32. Yi SM, Son SW, Lee KG, et al. Gender-specific association of androgenetic alopecia with metabolic syndrome in a middle-aged Korean population. *Br J Dermatol* 2012;167:306-13.
33. Abdel Fattah NS, Darwish YW. Androgenetic alopecia and insulin resistance: are they truly associated? *Int J Dermatol* 2011;50:417-22.
34. Su LH, Chen LS, Lin SC, Chen HH. Association of androgenetic alopecia with mortality from diabetes mellitus and heart disease. *JAMA Dermatol* 2013;149:601-6.
35. Mansouri P, Mortazavi M, Eslami M, Mazinani M. Androgenetic alopecia and coronary artery disease in women. *Dermatol Online J* 2005;11:2.
36. Arias-Santiago S, Gutierrez-Salmeron MT, Castellote-Caballero L, Buendia-Eisman A, Naranjo-Sintes R. Androgenetic alopecia and cardiovascular risk factors in men and women: a comparative study. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:420-9.
37. Messenger AG. Hair through the female life cycle. *Br J Dermatol* 2011;165 Suppl 3:2-6.
38. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 1999;341:491-7.
39. Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol Med* 2001;7:293-301.
40. Rebera A, Guarrera M. Kenogen. A new phase of the hair cycle? *Dermatology* 2002;205:108-10.
41. Garza LA, Liu Y, Yang Z, et al. Prostaglandin D2 inhibits hair growth and is elevated in bald scalp of men with androgenetic alopecia. *Sci Transl Med* 2012;4:126ra34.
42. Trueb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Exp Gerontol* 2002;37:981-90.
43. Milner Y, Sudnik J, Filippi M, Kizoulis M, Kashgarian M, Stenn K. Exogen, shedding phase of the hair growth cycle: characterization of a mouse model. *J Invest Dermatol* 2002;119:639-44.
44. Kishimoto J, Ehama R, Ge Y, et al. In vivo detection of human vascular endothelial growth factor promoter activity in transgenic mouse skin. *Am J Pathol* 2000;157:103-10.
45. Kishimoto J, Burgeson RE, Morgan BA. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev* 2000;14:1181-5.
46. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001;81:449-94.
47. Randall VA, Jenner TJ, Hibberts NA, De Oliveira IO, Vafaei T. Stem cell factor/c-Kit signalling in normal and androgenetic alopecia hair follicles. *J Endocrinol* 2008;197:11-23.
48. Hebert JM, Rosenquist T, Gotz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 1994;78:1017-25.
49. Sawaya ME, Blume-Peytavi U, Mullins DL, et al. Effects of finasteride on apoptosis and regulation of the human hair cycle. *J Cutan Med Surg* 2002;6:1-9.
50. Botchkareva NV, Kahn M, Ahluwalia G, Shander D. Survivin in the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 2007;127:479-82.
51. Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. Apoptosis in the hair follicle. *J Invest Dermatol* 2006;126:258-64.
52. van Scott EJ, Ekel TM. Geometric Relationships Between the Matrix of the Hair Bulb and its Dermal Papilla in Normal and Alopecic Scalp1. *J Invest Dermatol* 1958;31:281-7.
53. Whiting DA. Possible mechanisms of miniaturization during androgenetic alopecia or pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:S81-6.
54. Whiting DA. Advances in the treatment of male androgenetic alopecia: a brief review of finasteride studies. *Eur J Dermatol* 2001;11:332-4.
55. Jahoda CA. Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. *Exp Dermatol* 1998;7:235-48.
56. Seiberg M, Wisniewski S, Cauwenbergh G, Shapiro SS. Trypsin-induced follicular papilla apoptosis results in delayed hair growth and pigmentation. *Dev Dyn* 1997;208:553-64.
57. Randall VA. Androgens and hair growth. *Dermatol Ther* 2008;21:314-28.
58. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974;186:1213-5.
59. Kaufman KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198:89-95.
60. Kitagawa T, Matsuda K, Inui S, et al. Keratinocyte growth inhibition through the modification of Wnt signaling by androgen in balding dermal papilla cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1288-94.
61. Zimmer MP, Ziering C, Zeigler F, et al. Hair regrowth following a Wnt- and follistatin containing treatment: safety and efficacy in a first-in-man phase 1 clinical trial. *J Drugs Dermatol* 2011;10:1308-12.
62. Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, et al. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:578-89.
63. Finasteride MPHL Group. Long-term (5-year) multinational experience with finasteride 1 mg in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Eur J Dermatol* 2002;12:38-49.
64. Yeon JH, Jung JY, Choi JW, et al. 5 mg/day finasteride treatment for normoandrogenic Asian women with female pattern hair loss. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:211-4.

65. Iorizzo M, Vincenzi C, Voudouris S, Piraccini BM, Tosti A. Finasteride treatment of female pattern hair loss. *Arch Dermatol* 2006;142:298-302.
66. Gupta AK, Charrette A. The efficacy and safety of 5alpha-reductase inhibitors in androgenetic alopecia: a network meta-analysis and benefit-risk assessment of finasteride and dutasteride. *J Dermatolog Treat* 2013;25:156-61.
67. Eun HC, Kwon OS, Yeon JH, et al. Efficacy, safety, and tolerability of dutasteride 0.5 mg once daily in male patients with male pattern hair loss: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:252-8.
68. Olszewska M, Rudnicka L. Effective treatment of female androgenic alopecia with dutasteride. *J Drugs Dermatol* 2005;4:637-40.
69. Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5alpha-reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 1997;109:296-300.
70. Mahe YF, Michelet JF, Billoni N, et al. Androgenetic alopecia and microinflammation. *Int J Dermatol* 2000;39:576-84.
71. Stefanato CM. Histopathology of alopecia: a clinicopathological approach to diagnosis. *Histopathology* 2010;56:24-38.
72. Whiting DA. Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:755-63.
73. Nyholt DR, Gillespie NA, Heath AC, Martin NG. Genetic basis of male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2003;121:1561-4.
74. Bergfeld WF. Androgenetic alopecia: an autosomal dominant disorder. *Am J Med* 1995;98:95S-8S.
75. Yazdan P. Update on the genetics of androgenetic alopecia, female pattern hair loss, and alopecia areata: implications for molecular diagnostic testing. *Semin Cutan Med Surg* 2012;31:258-66.
76. Lee R, Chang SY, Trinh H, et al. Genetic studies on the functional relevance of the protein prenyltransferases in skin keratinocytes. *Hum Mol Genet* 2010;19:1603-17.
77. Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5alpha-reductase genes. *J Invest Dermatol* 1998;110:849-53.
78. Birch MP, Messenger AG. Genetic factors predispose to balding and non-balding in men. *Eur J Dermatol* 2001;11:309-14.
79. Ellis JA, Harrap SB. The genetics of androgenetic alopecia. *Clin Dermatol* 2001;19:149-54.
80. Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2001;116:452-5.
81. el-Samahy MH, Shaheen MA, Saddik DE, et al. Evaluation of androgen receptor gene as a candidate gene in female androgenetic alopecia. *Int J Dermatol* 2009;48:584-7.
82. Sawaya ME, Shalita AR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism, and acne. *J Cutan Med Surg* 1998;3:9-15.
83. Calvo RM, Asuncion M, Sancho J, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. The role of the CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of skewed X-chromosome inactivation, in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1735-40.
84. Yip L, Zaloumis S, Irwin D, et al. Gene-wide association study between the aromatase gene (CYP19A1) and female pattern hair loss. *Br J Dermatol* 2009;161:289-94.
85. Li R, Brockschmidt FF, Kiefer AK, et al. Six novel susceptibility loci for early-onset androgenetic alopecia and their unexpected association with common diseases. *PLoS Genet* 2012;8:e1002746.
86. Redler S, Dobson K, Drichel D, et al. Investigation of six novel susceptibility loci for male androgenetic alopecia in women with female pattern hair loss. *J Dermatol Sci* 2013;72:186-8.
87. Heilmann S, Kiefer AK, Fricker N, et al. Androgenetic alopecia: identification of four genetic risk loci and evidence for the contribution of WNT signaling to its etiology. *J Invest Dermatol* 2013;133:1489-96.
88. Nuwaihdy R, Redler S, Heilmann S, et al. Investigation of four novel male androgenetic alopecia susceptibility loci: no association with female pattern hair loss. *Arch Dermatol Res* 2013:[ahead of print].
89. Gatherwright J, Liu MT, Gliniak C, Totonchi A, Guyuron B. The contribution of endogenous and exogenous factors to female alopecia: a study of identical twins. *Plast Reconstr Surg* 2012;130:1219-26.
90. Blume-Peytavi U, Blumeyer A, Tosti A, et al. S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescents. *Br J Dermatol* 2011;164:5-15.
91. Sinclair R, Wewerinke M, Jolley D. Treatment of female pattern hair loss with oral antiandrogens. *Br J Dermatol* 2005;152:466-73.
92. Olsen EA. The midline part: an important physical clue to the clinical diagnosis of androgenetic alopecia in women. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:106-9.
93. Olsen EA. Current and novel methods for assessing efficacy of hair growth promoters in pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:253-62.
94. Hamilton JB. Patterned loss of hair in man; types and incidence. *Ann N Y Acad Sci* 1951;53:708-28.
95. Lee WS, Oh Y, Ji JH, et al. Analysis of familial factors using the basic and specific (BASP) classification in Korean patients with androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:40-7.

96. Lee WS, Lee HJ, Choi GS, et al. Guidelines for management of androgenetic alopecia based on BASP classification--the Asian Consensus Committee guideline. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:1026-34.
97. Lee WS, Ro BI, Hong SP, et al. A new classification of pattern hair loss that is universal for men and women: basic and specific (BASP) classification. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:37-46.
98. Trueb RM. Systematic approach to hair loss in women. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010;8:284-97.
99. Bi MY, Cohen PR, Robinson FW, Gray JM. Alopecia syphilitica-report of a patient with secondary syphilis presenting as moth-eaten alopecia and a review of its common mimickers. *Dermatol Online J* 2009;15:6.
100. Rebora A. Acute diffuse and total alopecia of the female scalp: a new subtype of diffuse alopecia areata that has a favorable prognosis--a reply. *Dermatology* 2003;207:339; author reply 40.
101. Levine N. Diffuse thinning of scalp hair. *Geriatrics* 2000;55:33.
102. Tosti A, Peluso AM, Misciali C, Venturo N, Patrizi A, Fanti PA. Loose anagen hair. *Arch Dermatol* 1997;133:1089-93.
103. Lee JY, Hsu ML. Alopecia syphilitica, a simulator of alopecia areata: histopathology and differential diagnosis. *J Cutan Pathol* 1991;18:87-92.
104. Jillson OF. Alopecia. III. Diffuse hair loss (nonscarring). *Cutis* 1983;31:465, 9, 72 passim.
105. Whiting DA. Chronic telogen effluvium: increased scalp hair shedding in middle-aged women. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:899-906.
106. Chartier MB, Hoss DM, Grant-Kels JM. Approach to the adult female patient with diffuse nonscarring alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:809-18; quiz 18-20.
107. Miteva M, Misciali C, Fanti PA, Tosti A. Histopathologic features of alopecia areata incognito: a review of 46 cases. *J Cutan Pathol* 2012;39:596-602.
108. Finner AM. Alopecia areata: Clinical presentation, diagnosis, and unusual cases. *Dermatol Ther* 2011;24:348-54.
109. Priego-Recio CM, Rodriguez-Pichardo A, Camacho-Martinez FM. Unusual forms of alopecia areata in a Trichology Unit. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013:[ahead of print].
110. Tosti A, Piraccini BM, Sisti A, Duque-Estrada B. Hair loss in women. *Minerva Ginecol* 2009;61:445-52.
111. Ross EK, Vincenzi C, Tosti A. Videodermoscopy in the evaluation of hair and scalp disorders. *J Am Acad Dermatol* 2006;55:799-806.
112. Ekmekci TR, Koslu A. Phototrichogram findings in women with androgenetic alopecia. *Skin Res Technol* 2006;12:309-12.
113. Ramos LD, Santili MC, Bezerra FC, Ruiz Mde F, Petri V, Patriarca MT. Dermoscopic findings in female androgenetic alopecia. *An Bras Dermatol* 2012;87:691-4.
114. Rakowska A, Slowinska M, Kowalska-Oledzka E, Olszewska M, Rudnicka L. Dermoscopy in female androgenic alopecia: method standardization and diagnostic criteria. *Int J Trichology* 2009;1:123-30.
115. Deloche C, de Lacharriere O, Misciali C, et al. Histological features of peripilar signs associated with androgenetic alopecia. *Arch Dermatol Res* 2004;295:422-8.
116. Gassmuller J, Rowold E, Frase T, Hughes-Formella B. Validation of TrichoScan technology as a fully-automated tool for evaluation of hair growth parameters. *Eur J Dermatol* 2009;19:224-31.
117. Hoffmann R. TrichoScan: combining epiluminescence microscopy with digital image analysis for the measurement of hair growth in vivo. *Eur J Dermatol* 2001;11:362-8.
118. Kantor J, Kessler LJ, Brooks DG, Cotsarelis G. Decreased serum ferritin is associated with alopecia in women. *J Invest Dermatol* 2003;121:985-8.
119. Rushton DH, Ramsay ID. The importance of adequate serum ferritin levels during oral cyproterone acetate and ethinyl oestradiol treatment of diffuse androgen-dependent alopecia in women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;36:421-7.
120. Trost LB, Bergfeld WF, Calogeras E. The diagnosis and treatment of iron deficiency and its potential relationship to hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:824-44.
121. Futterweit W, Dunaif A, Yeh HC, Kingsley P. The prevalence of hyperandrogenism in 109 consecutive female patients with diffuse alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1988;19:831-6.
122. Freinkel RK, Freinkel N. Hair growth and alopecia in hypothyroidism. *Arch Dermatol* 1972;106:349-52.
123. Rasheed H, Mahgoub D, Hegazy R, et al. Serum ferritin and vitamin d in female hair loss: do they play a role? *Skin Pharmacol Physiol* 2013;26:101-7.
124. Amor KT, Rashid RM, Mirmirani P. Does D matter? The role of vitamin D in hair disorders and hair follicle cycling. *Dermatol Online J* 2010;16:3.
125. Malloy PJ, Feldman D. The role of vitamin D receptor mutations in the development of alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2011;347:90-6.
126. Lever WF, Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF. *Lever's histopathology of the skin*. 9th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
127. Penha MA, Santos PM, Miot HA. Dimensioning the fear of dermatologic diseases. *An Bras Dermatol* 2012;87:796-9.
128. Dolte KS, Girman CJ, Hartmaier S, Roberts J, Bergfeld W, Waldstreicher J. Development of a health-related quality of life questionnaire for women with androgenetic alopecia. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:637-42.

129. Tsuboi R, Itami S, Inui S, et al. Guidelines for the management of androgenetic alopecia (2010). *J Dermatol* 2012;39:113-20.
130. Gupta AK, Daigle D. The use of low-level light therapy in the treatment of androgenetic alopecia and female pattern hair loss. *J Dermatolog Treat* 2014;25:162-3.
131. Levy LL, Emer JJ. Female pattern alopecia: current perspectives. *Int J Womens Health* 2013;5:541-56.
132. Vogel JE, Jimenez F, Cole J, et al. Hair restoration surgery: the state of the art. *Aesthet Surg J* 2013;33:128-51.
133. Unger RH. Female hair restoration. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2013;21:407-17.
134. Bagatin E, Miot HA. How to design and write a clinical research protocol in Cosmetic Dermatology*. *An Bras Dermatol* 2013;88:69-75.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a apoptose e a expressão de receptores de hidrocarboneto arílico dos folículos pilosos (terminais e miniaturizados) em pacientes com alopecia de padrão feminino e controles.

Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão de receptores de hidrocarboneto arílico nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.
2. Avaliar a apoptose nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.
3. Caracterizar o infiltrado inflamatório nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.
4. Avaliar a associação do infiltrado inflamatório com apoptose; e com a expressão de receptores de hidrocarboneto arílico nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.

Segundo manuscrito

Artigo de investigação em português segundo as normas do *Journal of Cutaneous Pathology*

Título: Apoptose, microinflamação e expressão de receptores de hidrocarboneto arílico nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.

Title: Apoptosis, microinflammation and expression of aryl hydrocarbon receptors in hair follicles of patients with female pattern hair loss.

Título breve: Apoptose, inflamação e receptores de hidrocarboneto arílico em APF.

Autores:

Paulo Müller Ramos

Médico dermatologista, Mestrando em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Gabrielli Brianezi

Biomédica, Mestre e Doutoranda em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Ana Carolina Pereira Martins

Biomédica, Mestre e Doutora em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Márcia Guimarães da Silva

Bióloga, Professora assistente doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Mariângela Esther Alencar Marques

Médica Patologista, Professora assistente doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Hélio Amante Miot

Médico Dermatologista, Professor assistente doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Local de desenvolvimento do trabalho:

Departamentos de Dermatologia e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

Conflito interesse: Nenhum

Financiamento: FUNADERSP: no. 01/2013

RESUMO:

Fundamentos: A patogenia da alopecia de padrão feminino não está esclarecida, sofrendo influência de fatores genéticos, hormonais e de exposição ambiental. Os receptores de hidrocarboneto arílico podem ser ativados por diversos ligantes ambientais como poluentes (p.ex. dioxinas), fumaça do tabaco, radiação ultravioleta e ação microbiana (p.ex. Malassezia sp.), podendo exercer atividade proinflamatória, apoptótica, hormonal e carcinogênica, de acordo o ligante e o tecido alvo. Sua ação no folículo piloso e na alopecia de padrão feminino não foi ainda estudada.

Objetivo: Avaliar a apoptose, infiltrado inflamatório e expressão de receptores de hidrocarboneto arílico nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino.

Métodos: Estudo transversal envolvendo 17 mulheres com alopecia de padrão feminino e cinco controles. Avaliaram-se amostras de pele do couro cabeludo que foram processados para HE, técnica do TUNEL e imuno-histoquímica para receptor de hidrocarboneto arílico. As variáveis foram comparadas de acordo com o grupo de folículos (terminal *versus* miniaturizado) e os grupos de pacientes (alopecia *versus* controles).

Resultados: Houve maior índice de apoptose (TUNEL) entre os folículos miniaturizados e entre os casos, além de significativa interação entre a categoria folicular e casos ($p < 0,01$). Folículos miniaturizados apresentaram maior escore de expressão nuclear de receptor de hidrocarboneto arílico ($p = 0,03$), observando-se correlação independente entre a marcação citoplasmática e nuclear nos folículos

($p < 0,01$). Houve correlação entre o infiltrado inflamatório e a apoptose nos folículos miniaturizados ($r_s = 0,60$; $p < 0,01$).

Conclusões: Apoptose, microinflamação e receptor de hidrocarboneto arílico apresentaram padrões característicos nos pacientes com alopecia de padrão feminino. Receptor de hidrocarboneto arílico pode ser uma via de promoção da apoptose e miniaturização dos fios induzida por estímulos ambientais.

Palavras-chave: Alopecia, Alopecia androgênica, Apoptose, Dioxinas, Inflamação.

ABSTRACT:

Background: The pathogenesis of female pattern hair loss is unclear and influenced by genetic, hormonal factors and environmental exposure. The aryl hydrocarbon receptor can be activated by many environmental ligands such as pollutants (dioxins), tobacco smoke, ultraviolet radiation and microbial action (e.g. *Malassezia* sp.). When activated, exerts diverse biological activities, such as proinflammatory, apoptotic, hormonal and carcinogenic, according to the ligand and the tissue. Its action in the hair follicle and in female pattern hair loss has not been studied yet.

Objectives: To evaluate apoptosis, inflammatory infiltrate and expression of aryl hydrocarbon receptors in the hair follicles of patients with female pattern hair loss.

Methods: Cross-sectional study involving 17 women with female pattern alopecia and five controls. We evaluated samples of scalp skin that were processed for HE and TUNEL technique of immunohistochemistry to the aryl hydrocarbon receptor. The variables were compared according to the group of follicles (miniaturized *versus* terminal) and patient groups (alopecia *versus* controls).

Results: There was a higher rate of apoptosis (TUNEL) in the miniaturized follicles and in cases, and a significant interaction between follicular status and cases ($p < 0.01$). Miniaturized follicles had higher scores of nuclear expression of aryl hydrocarbon receptor ($p = 0.03$), observing independent correlation between cytoplasmic and nuclear staining in the follicles ($p < 0.01$). There was a correlation between the inflammation and apoptosis in miniaturized follicles ($r_s = 0.60$, $p < 0.01$).

Conclusions: Apoptosis, microinflammation and aryl hydrocarbon receptor showed specific configurations in patients with female pattern hair loss. Aryl hydrocarbon

receptor can be a pathway to promote apoptosis and miniaturization induced by environmental stimuli.

Key-words: Alopecia, Androgenic alopecia, Apoptosis, Dioxins, Inflammation, Aryl hydrocarbon receptors

Introdução

Alopecia de padrão feminino (APF), ou alopecia androgenética feminina, é uma forma não cicatricial de alopecia do couro cabeludo, comum em mulheres adultas e que gera importante impacto à qualidade de vida. É causada pela miniaturização progressiva dos folículos pilosos e término precoce da fase ativa de crescimento do pelo (anágena) evoluindo com redução da densidade dos fios.^{1,2}

A fisiopatologia desse processo não é completamente compreendida. O componente genético é marcante e há evidências da participação de hormônios sexuais.^{3,4} O processo de apoptose participa tanto do encerramento da fase anágena como possivelmente da miniaturização da papila dérmica.^{5,6} O papel de fatores ambientais ainda não foi estabelecido.^{7,8}

Os receptores de hidrocarboneto arílico (AhR) são ligantes citoplasmáticos, que quando ativados migram para o núcleo e se ligam ao translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto (ARNT). Esse complexo induz a transcrição de genes que apresentam ligantes de AhR em seus promotores, conhecidos como elementos de resposta xenobiótica (XRE) (Apêndice 1).⁹

O AhR pode ser ativado por ligantes sintéticos e naturais.¹⁰ Os principais ligantes exógenos sintéticos são as dioxinas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Essas substâncias são poluentes ambientais e também estão presentes na fumaça do tabaco.¹¹ Ligantes naturais podem ser produzidos na pele por ação da *Malassezia furfur* e radiação ultravioleta.^{12,13}

Os efeitos biológicos da ativação dos AhR são diferentes em diferentes tecidos, acarretando desde alterações no ciclo celular, proliferação, diferenciação, interrupção, inflamação e apoptose.^{11,14,15}

A ação do AhR não foi ainda estudada adequadamente no folículo piloso, tampouco seu papel na fisiopatologia da APF. Neste trabalho, os autores propõem avaliar a expressão diferencial de AhR, a avaliação da microinflamação e a ocorrência de apoptose dos folículos pilosos (terminais e miniaturizados) em pacientes com APF.

Casuística e métodos

Estudo tipo transversal em que foram incluídas 17 pacientes do sexo feminino portadoras de APF (diagnóstico clínico e anatomopatológico), sem restrição de idade ou fototipo, cujo couro cabeludo foi biopsiado (*punch* 4 mm), com finalidade diagnóstica, durante seus atendimentos no ambulatório público de dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), no período de janeiro de 2009 a janeiro de 2012.

Como seus controles, foram selecionadas cinco pacientes do sexo feminino, que foram submetidas à biópsia do couro cabeludo para a investigação diagnóstica de queda de cabelo, mas que não apresentaram critérios histopatológicos de APF, sendo excluídas pacientes com outras dermatoses do couro cabeludo.

O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa da instituição (nº 4039/2012) (Anexo 1).

Os fragmentos de pele do couro cabeludo foram processados e fixados em blocos de parafina. Cortes transversais aos folículos, com 3µm de espessura, na altura da zona *bulge*, foram utilizados nos ensaios do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling assay*), coloração histoquímica (hematoxilina-eosina) e marcação imuno-histoquímica.

A microinflamação foi avaliada nas lâminas coradas pelo HE, a partir de escore semiquantitativo (0 a 4+), de acordo com a identificação de grupos de até dez células mononucleares em torno do folículo (1+), 10 a 20 células (2+) e assim sucessivamente. Foi considerado o maior escore dos folículos como o representativo do paciente.

A apoptose nos folículos foi avaliada pela técnica do TUNEL. Para sua realização, os cortes histológicos foram submetidos ao protocolo do fabricante (Trevigen).

A marcação por imuno-histoquímica foi realizada pelo método avidina-biotina-peroxidase.¹⁶ Foram utilizados anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis para o receptor de dioxina (AhR - Aryl hydrocarbon Receptor antibody; ab2770; Abcam).

Os cortes das amostras foram estendidos em lâminas histológicas de vidro 76x26mm/3x1, foscas, previamente tratadas com organo-silano. Após permanecerem por cerca de 18 horas em estufa a 58°C, os cortes aderidos às lâminas histológicas de vidro passaram pelo processo de desparafinização em xilol e em seguida pelo etanol absoluto seguindo para hidratação.

A reação imunoistoquímica foi realizada seguindo os seguintes passos: Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos em temperatura ambiente. Recuperação antigênica pelo calor,

utilizando-se solução Trilogy (Cell Marque) em estufa de cultura de células a 80° C por 1 hora e 30 minutos. Incubação do anticorpo primário (diluição 1:100) em geladeira 4° (overnight). Incubação com sistema de ligação conjugado LSAB (Dako) por 30 minutos. Incubação com sistema de amplificação streptavidina LSAB (Dako) por 30 minutos.

Os marcadores foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB Substrate Kit Cell Marque) e contra corados em hematoxilina segundo Harris (MERCK). Os cortes aderidos às lâminas histológicas de vidro passaram pelo processo de desidratação em etanol absoluto e em seguida passaram para o xilol. Por fim as lâminas foram montadas com lamínulas 24x60 (KNITTEL) por meio de resina sintética Permount (FISHER).

A identificação das estruturas do folículo piloso, classificação visual dos folículos, quantificação do infiltrado inflamatório (0 a 4+), avaliação do ensaio TUNEL e análise das marcações imuno-histoquímicas foram supervisionadas por dermatopatologista experiente (M.E.A.M.).

Os folículos individualizados foram fotografados de forma padronizada por microscópio Coolscope II, Nikon Instruments Inc. Tokyo, Japan, 2009, resolução de 1280x960 pixels, 24bits de cor (RGB), gerando imagens tipo bmp, sob objetiva 20x. A escala das imagens foi de 2,97 pixel/micra.

O escore de apoptose pelo ensaio do TUNEL foi realizado a partir da contagem média do número de núcleos fortemente marcados em cada categoria de folículo (terminal ou miniaturizado), em cada sujeito.

A marcação nuclear do AhR foi estimada pelo HSCORE, a partir da média de cada categoria de folículo, em cada sujeito. HSCORE é um método de avaliação da intensidade e extensão da imunoreatividade tecidual, desenvolvido

para receptores de hormônios esteroides. É obtido a partir da fórmula: $3x$ a percentagem de núcleos fortemente marcados + $2x$ a percentagem dos núcleos moderadamente marcados + a percentagem dos fracamente marcados; resultando em um escore que varia de 0 a 300.¹⁷

A intensidade de marcação citoplasmática do AhR foi estimada a partir da subtração do valor médio do histograma de cor de uma região representativa do citoplasma do folículo, com o fundo da lâmina, a partir do software ImageJ 1.47.¹⁸

As variáveis dependentes analisadas no estudo foram: número de núcleos fortemente marcados pelo TUNEL (apoptose) por folículos, infiltrado inflamatório perifolicular, HSCORE (AhR) e intensidade de marcação citoplasmática (AhR). As variáveis independentes foram a categoria do folículo (terminal ou miniaturizado) e os grupos de sujeitos (APF e controle).

A unidade de análise foi cada sujeito, e sua comparação interna quanto à categoria de seus folículos. Indivíduos sem representação de uma categoria de folículos (p.ex. terminais) assumiram valor “zero” para esse dado.

Dados categóricos foram representados pelas suas proporções percentuais, e variáveis de natureza quantitativas foram descritas por suas médias e desvios padrão ou medianas e quartis (p25 e p75), se a normalidade não fosse evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk.¹⁹

Dados quantitativos foram comparados entre os grupos e de acordo com a categoria folicular (miniaturizado ou terminal) por modelo linear generalizado de efeitos mistos, ajustado para a distribuição de probabilidade e estimativa de covariância robusta.¹⁹

A correlação entre HSCORE e a intensidade de marcação citoplasmática (AhR) foi realizada pelo coeficiente de correlação linear de Spearman (r_s). A exploração multivariada dessa correlação foi realizada por modelo linear generalizado e a dimensão da correlação foi estimada pelo coeficiente beta da regressão.¹⁹

Dados foram tabulados em MSExcel 2007 para análise posterior pelo *software* IBM SPSS 20.0.²⁰ Foi considerado significativo valor de $p \leq 0,05$.

O dimensionamento amostral (17 pacientes) baseou-se na capacidade de detecção de diferenças de mais de 20% na expressão dos receptores entre as categorias de folículos, considerando-se um poder de 80% e alfa bicaudal de 5%.

Resultados

Foram avaliados fragmentos de pele do couro cabeludo de 17 mulheres com APF e cinco controles atendidos no serviço de dermatologia da instituição. As medianas (p25-p75) das idades foram 42 (26-61) anos para APF e 44 (39-60), para seus controles.

A classificação visual da categoria do folículo (miniaturizados ou terminais) pelo avaliador correlacionou-se satisfatoriamente com o diâmetro dos folículos, com área sob a curva ROC de 0,95 (IC 95% 0,92 a 0,97) (Apêndice 2).

A marcação pelo TUNEL avaliou 213 folículos terminais e 224 folículos miniaturizados em boas condições de análise (Figuras 1a e 1b). A densidade de folículos miniaturizados entre casos foi de 11,9 folículos/paciente e entre controles

4,4 folículos/paciente. A proporção média de folículos miniaturizados em relação aos terminais foi de 92% entre os casos e 33% entre controles.

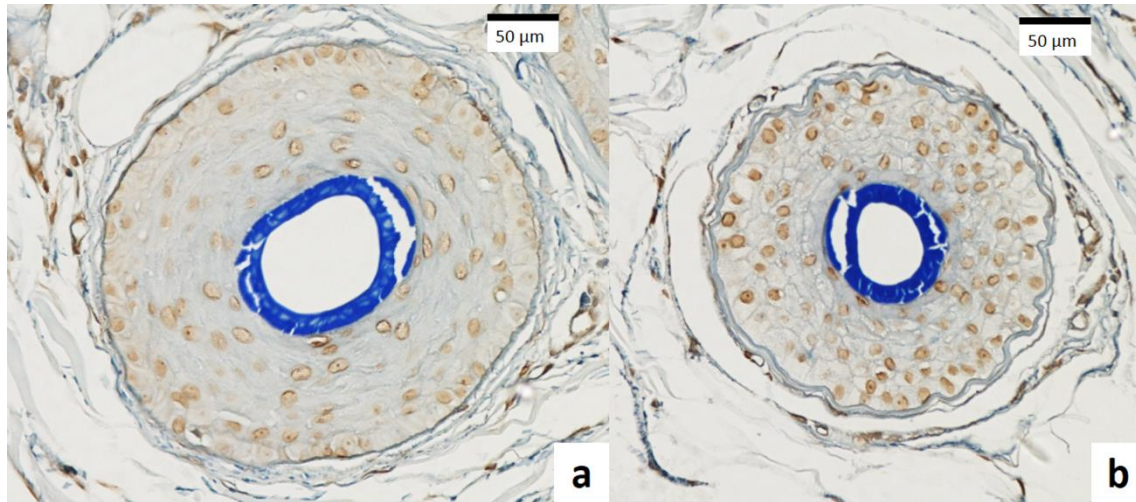


Figura 1. Cortes transversais de folículos pilosos marcados pelo TUNEL. a. Folículo terminal. b. Folículo miniaturizado.

Apoptose ocorreu em todas as camadas do folículo. O número de núcleos fortemente marcados, de acordo com a categoria do folículo está disposto na tabela 1. Houve maior índice de apoptose entre os folículos miniaturizados e entre os casos, além de significativa interação entre a categoria folicular e casos ($p < 0,01$) (Apêndice 3).

A marcação imuno-histoquímica permitiu a avaliação de 179 folículos terminais e 179 miniaturizados em boas condições de análise (Figuras 2a e 2b). A densidade de folículos miniaturizados entre casos foi de 10,0 folículos/paciente e entre controles 1,8 folículos/paciente. A proporção média de folículos miniaturizados em relação aos terminais foi de 55% entre os casos e 18% entre controles.

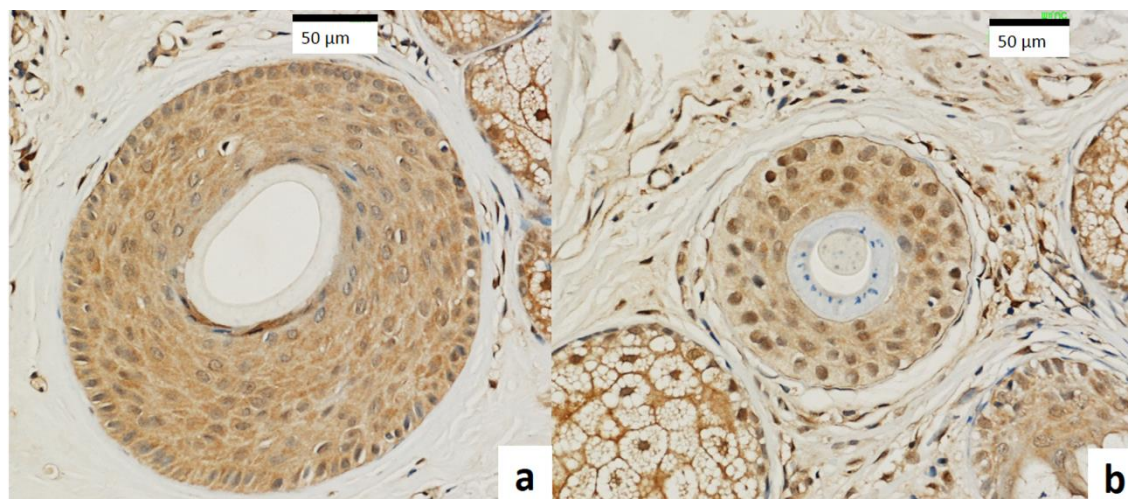


Figura 2. Cortes transversais de folículos pilosos marcados pela imuno-histoquímica de AhR. a. Foliculo terminal. b. Foliculo miniaturizado.

As expressões nuclear e citoplasmática de AhR ocorreram difusamente em todas as camadas do folículo. O escore de marcação nuclear evidenciou que folículos miniaturizados apresentaram maior expressão AhR. A intensidade da marcação citoplasmática do AhR não variou entre os diferentes status de folículo, ou entre os grupos (Tabela 1 e Apêndice 4).

Tabela 1. Marcação do TUNEL, expressão do AhR nuclear (HSCORE) e citoplasmática dos sujeitos com APF e controles.

Variáveis [#]	APF (n=17)		Controle (n=5)		p(grupo)	p(cat)	p(grupo*cat)
	Terminal	Miniaturizado	Terminal	Miniaturizado			
TUNEL ^a	0 (0-23)	47 (20-65)	14 (5-33)	14 (11-23)	<0,01	<0,01	<0,01
HSCORE ^b	113 (92-148)	139 (114-164)	103 (60-129)	122 (98-154)	0,56	0,03	0,84
Citoplasma ^c	54 (44-61)	51 (46-57)	19 (18-25)	14 (13-23)	0,12	0,71	0,26

[#] mediana (p25-p75); cat: categoria do folículo

^a Número de núcleos marcados por folículo em cada sujeito; ^b Escore de marcação nuclear do AhR; ^c Intensidade de marcação citoplasmática relativa ao fundo da lâmina.

Quando avaliados os folículos independentemente, a análise multivariada evidenciou correlação negativa entre a marcação nuclear e citoplasmática nos

folículos, assim como de acordo com o grupo, a categoria do folículo e a interação grupo*folículo (Tabela 2 e Apêndices 5 a 7).

Tabela 2. Modelo linear generalizado da expressão nuclear de AhR (HSCORE) nos folículos (n=358), em relação à marcação citoplasmática de AhR, de acordo com o grupo diagnóstico e a categoria de miniaturização do folículo.

Variável	Coefficiente β	p
Intensidade citoplasmática	-0,48	<0,01
Grupo APF	31,87	0,02
Miniaturização	11,34	<0,01
APF*Miniaturização	28,38	0,04
p (intercepto) <0,01; p (modelo) <0,01		

A presença de infiltrado inflamatório mononuclear ao redor dos folículos miniaturizados foi modesta nos pacientes (<10 células por corte). Porém, houve correlação direta entre o grau do infiltrado e a medida de apoptose nos folículos miniaturizados ($r_s=0,68$; $p=0,01$) (Apêndice 8).

Quanto ao AhR, o infiltrado inflamatório correlacionou-se marginalmente com a marcação citoplasmática ($r_s= -0,40$; $p=0,10$), mas não com o HSCORE nuclear ($r_s=0,10$; $p=0,66$).

Discussão

Foi evidenciada variação na expressão do AhR entre APF e controles, havendo correlação entre a migração citoplasmática para o núcleo (ativação), dependendo do grupo, da categoria do folículo e da interação entre eles.

Apoptose foi mais evidente no grupo APF, e em folículos miniaturizados, correlacionando-se com o infiltrado inflamatório, o que sugere seu papel no processo de miniaturização da doença.

Apesar da sua alta prevalência, a fisiopatologia da APF não é completamente conhecida. O conceito inicial que a APF tratava-se de entidade principalmente andrógeno-dependente ainda não foi confirmado, e a resposta inconstante ao tratamento com medicamentos antiandrogênicos favorecem a hipótese de outros elementos envolvidos.²¹ APF apresenta evidências de etiologia multifatorial: além de fatores genéticos e hormonais, fatores ambientais também devem estar envolvidos.⁷

O processo de miniaturização dos folículos que ocorre na APF pode ser acompanhado por um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário leve a moderado na região peri-infundibular.^{22,23} Essa inflamação pode estar associada à miniaturização e posterior fibrose que ocorre nos folículos na APF.²⁴

O fato do processo inflamatório ocorrer na parte alta do folículo sugere que o fator causal incidir nessa região. Portanto, fatores externos como radiação ultravioleta, poluentes ambientais e habitantes da microbiota da pele e do folículo como *Propionibacterium sp.*; *Staphylococcus sp.*; *Malassezia sp.* dentre outros poderiam estar envolvidos.²⁴

Além de efeitos inflamatórios e proapoptóticos, o AhR pode exercer atividade estrogênica, e dessa forma poderia influenciar no ciclo do pelo e participar da fisiopatologia da APF de diversas maneiras.²⁵

Um estudo envolvendo amplo questionário em 98 gêmeas idênticas levantou diversos fatores ambientais possivelmente relacionados à APF. Dentre

eles destacaram-se: níveis aumentados de testosterona, estresse psicológico, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, tabagismo, múltiplos casamentos, maior exposição solar, maior renda e pouca atividade física.²⁶

Um outro estudo tailandês com 26226 mulheres buscou identificar possíveis fatores de risco associados à APF e evidenciou associação positiva entre índice de massa corporal > 26 (OR=1,1), glicemia de jejum > 110 mg/dl (OR=1,1), puberdade antes dos 16 anos (OR=1,2), menor (≤ 3) número de partos (OR=1,2), uso de anticoncepcional hormonal oral por período maior de um ano (OR=1,2) e exposição solar por tempo maior que 16 horas por semana (OR: 1,2) com APF. Porém, mulheres que amamentaram (OR=0,9), protegeram-se do sol diariamente (OR=0,8) ou tiveram ciclo menstrual com duração menor que 35 dias (OR=0,9), apresentaram menor risco de desenvolver a doença. Esses dados sugerem potencial controle epigenético da APF mediado por fatores de exposição.⁸

AhR pode ser, no folículo piloso, também um mediador de inflamação, apoptose e miniaturização dos folículos promovido por estímulos ambientais, como a fumaça, *Malassezia sp.* e radiação ultravioleta.

Nosso estudo apresenta potenciais limitações ligadas ao tamanho amostral modesto (especialmente de controles), diferentes intensidades de APF e idades dos pacientes analisados. Apesar disso, foi possível evidenciar resultados ligados à apoptose, microinflamação e à expressão de AhR nesses pacientes.

Como este estudo foi realizado entre pacientes dermatológicos de instituição pública do Sudeste do Brasil, não podemos extrapolar seus resultados

para outras realidades e grupos étnico-raciais, que apresentam epidemiologias diferentes quanto à APF.

Investigações posteriores com amostragem representativa, quer clínico-epidemiológicos, quer que explorem a expressão gênica e o transcriptoma da via do AhR devem substanciar nossos achados, e definir o seu papel na fisiopatologia da APF.

Conclusão

Apoptose, microinflamação e receptor de hidrocarboneto arílico apresentaram padrões característicos nos pacientes com alopecia de padrão feminino. AhR pode ser uma via de promoção da apoptose e miniaturização dos fios induzida por estímulos ambientais, como a fumaça e radiação ultravioleta.

Referências bibliográficas

1. Olsen EA. Female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:S70-80.
2. Blume-Peytavi U, Blumeyer A, Tosti A, et al. S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescents. *Br J Dermatol* 2011;164:5-15.
3. Kaufman KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198:89-95.
4. Schweiger ES, Boychenko O, Bernstein RM. Update on the pathogenesis, genetics and medical treatment of patterned hair loss. *J Drugs Dermatol* 2010;9:1412-9.
5. Jahoda CA. Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. *Exp Dermatol* 1998;7:235-48.
6. Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. Apoptosis in the hair follicle. *J Invest Dermatol* 2006;126:258-64.
7. Messenger AG. Hair through the female life cycle. *Br J Dermatol* 2011;165 Suppl 3:2-6.
8. Su LH, Chen LS, Chen HH. Factors associated with female pattern hair loss and its prevalence in Taiwanese women: a community-based survey. *J Am Acad Dermatol* 2013;69:e69-77.
9. Ikuta T, Namiki T, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol* 2009;77:588-96.
10. Esser C, Bargon I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T, Krutmann J. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin Immunopathol* 2013;35:677-91.
11. Tsay JJ, Tchou-Wong KM, Greenberg AK, Pass H, Rom WN. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res* 2013;33:1247-56.
12. Gaitanis G, Magiatis P, Stathopoulou K, et al. AhR ligands, malassezin, and indolo[3,2-b]carbazole are selectively produced by *Malassezia furfur* strains isolated from seborrheic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008;128:1620-5.
13. Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J Invest Dermatol* 2011;131:203-10.
14. Nguyen NT, Hanieh H, Nakahama T, Kishimoto T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int Immunol* 2013;25:335-43.
15. Morita A, Torii K, Maeda A, Yamaguchi Y. Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2009;14:53-5.
16. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
17. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2309-17.
18. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 2007;43:25-30.
19. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics. The bare essentials. 3rd ed. Shelton, Connecticut: People's Medical Publishing House; 2008.
20. IBM SPSS 20.0 for Windows. In. 20 ed. Chicago (IL): SPSS Incorporation; 2011:Statistical Package for Social Science (SPSS).
21. Sinclair R. Winding the clock back on female androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 2012;166:1157-8.
22. Whiting DA. Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:755-63.
23. Stefanato CM. Histopathology of alopecia: a clinicopathological approach to diagnosis. *Histopathology* 2010;56:24-38.
24. Mahe YF, Michelet JF, Billoni N, et al. Androgenetic alopecia and microinflammation. *Int J Dermatol* 2000;39:576-84.
25. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 2003;423:545-50.
26. Gatherwright J, Liu MT, Gliniak C, Totonchi A, Guyuron B. The contribution of endogenous and exogenous factors to female alopecia: a study of identical twins. *Plast Reconstr Surg* 2012;130:1219-26.

Conclusões

1. Receptores de hidrocarboneto arílico se expressaram difusamente nos núcleos e citoplasmas dos folículos capilares de pacientes com alopecia de padrão feminino e controles, o que ocorreu com maior intensidade nos núcleos de folículos miniaturizados.
2. Células apoptóticas foram identificadas nos folículos pilosos de pacientes com alopecia de padrão feminino e controles. Houve maior frequência de apoptose nos fios miniaturizados e entre os casos. Em folículos miniaturizados dos casos, a apoptose foi mais numerosa que nos folículos miniaturizados dos controles.
3. O infiltrado inflamatório perifolicular de células mononucleares foi discreto, privilegiou os folículos miniaturizados e correlacionou-se positivamente ao escore de apoptose entre os miniaturizados.
4. Houve associação negativa e independente, entre a expressão nuclear e citoplasmática do receptor de hidrocarboneto arílico, mais proeminente nos folículos miniaturizados e entre os casos.
5. AhR pode ser uma via de promoção da apoptose e miniaturização dos fios induzida por estímulos ambientais, como a fumaça e radiação ultravioleta.

Perspectivas

Há a percepção positiva dos autores acerca do aumento de incidência da APF na população brasileira. O impacto à qualidade de vida, piora clínica progressiva com a idade e os tratamentos com resultados inconstantes são elementos que geram angústia no paciente e no clínico.

Considerando que o tratamento em fases precoces é mais eficiente em impedir a progressão da doença, a identificação de grupos susceptíveis é elementar na oportunidade de interromper a sua evolução.

Estudos epidemiológicos com metodologias e amostras robustas poderiam caracterizar, na miscigenada população brasileira, fatores de risco modificáveis e os componentes genéticos da doença. Estudos de segregação complexa nas famílias afetadas prestam-se a esse propósito, e poderiam ser um passo inicial na busca pelo controle da APF.

A investigação de grupos populacionais isolados de estímulos ambientais como radiação ultravioleta, poluição e tabagismo, por exemplo: comunidades religiosas isoladas (muçulmanas com burcas e menonitas), clausuras e conventos do interior do País, comparados com familiares urbanos, permitiria a mensuração do efeito das variáveis ambientais no controle epigenético da APF.

A verificação histológica da associação entre aumento da expressão de receptor de hidrocarboneto arílico e variáveis epidemiológicas como tabagismo, puberdade precoce, exposição à poluição e ao ultravioleta fortaleceria a identificação do meio de ação de fatores de exposição e ambientais no desenvolvimento de APF.

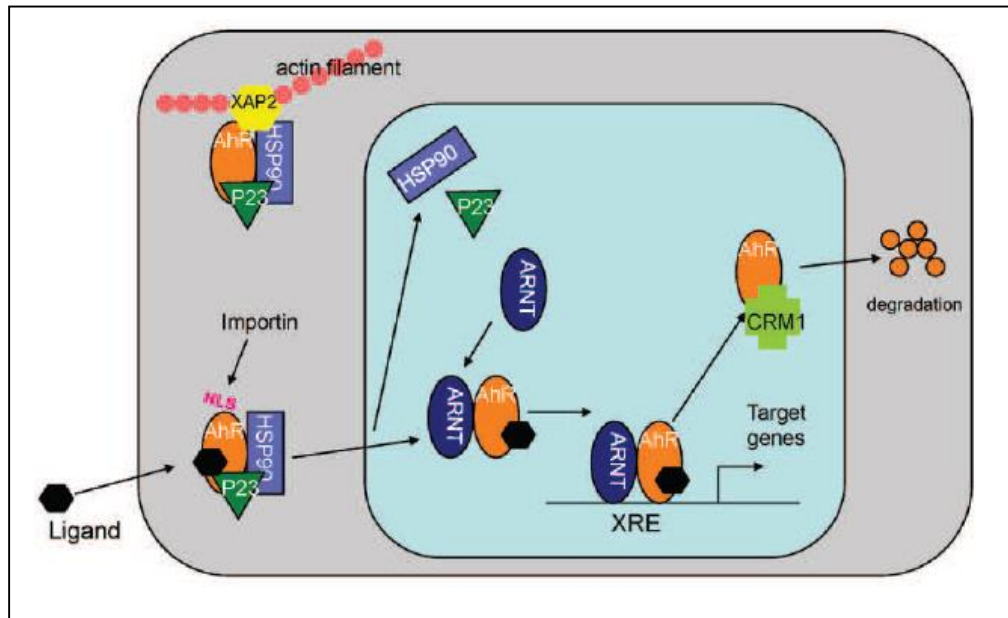
É elementar ainda aprimorar as técnicas de registro longitudinal da gravidade da APF, assim como a versão do WAA-QOL para o português brasileiro, a fim de instrumentalizar o País para a execução de ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos e controlados que levem a tratamentos mais efetivos para a doença.

A expressão de receptores de hidrocarboneto arílico deve ser também avaliada nos folículos pilosos de APM. A similitude clínica, da fisiopatologia e histologia, pode revelar as diferenças nas vias de indução da APF e APM.

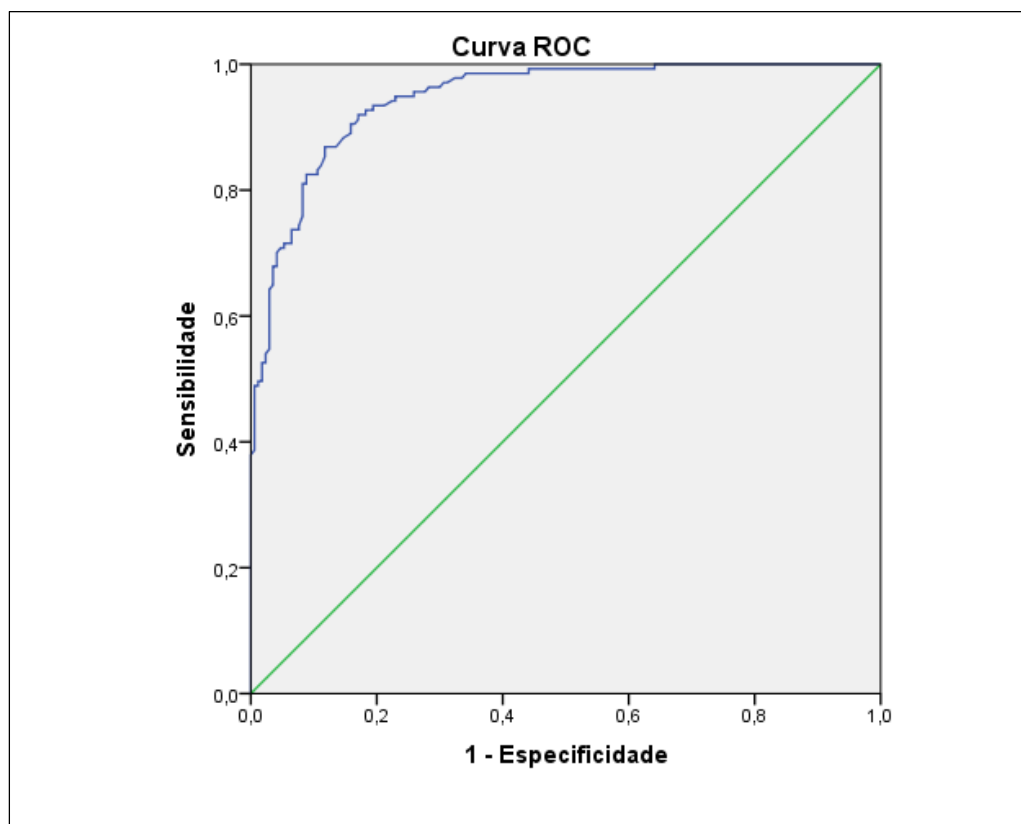
As recentes evidências que apontam para participação ambiental no desenvolvimento da APF devem ser valorizadas e exaustivamente investigadas, quanto ao mecanismo de miniaturização dos pelos. A fim de que se possa desenvolver estratégias de intervenção nesses elementos, e interromper a progressão da doença.

Apêndices

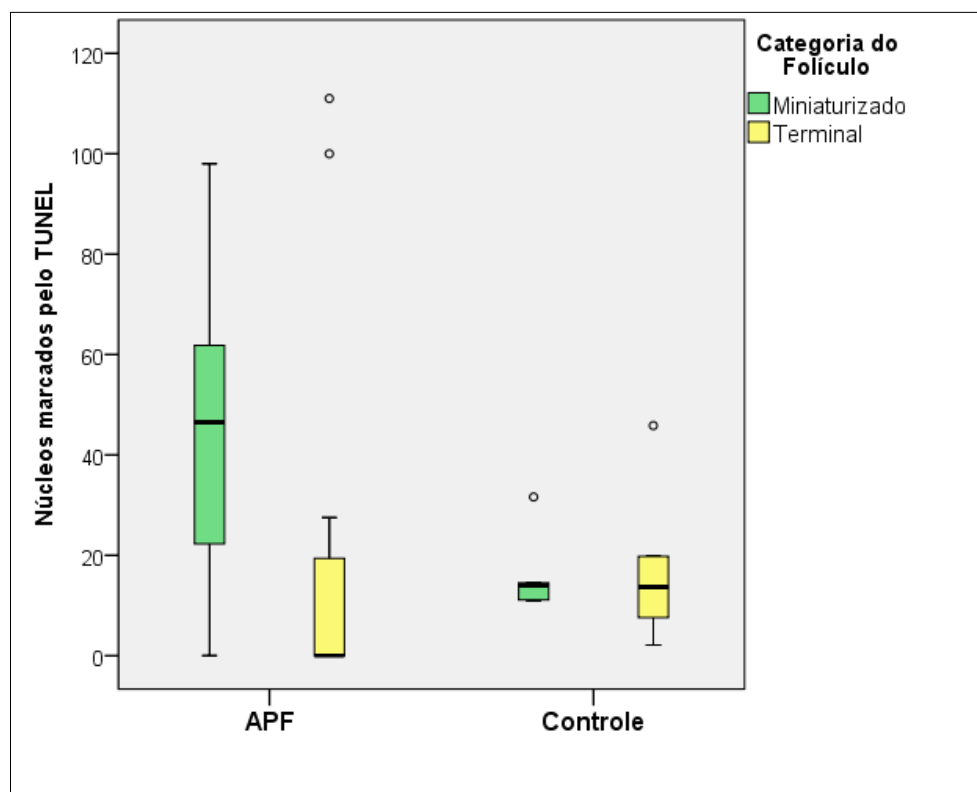
Apêndice 1.



Apêndice 1. Esquema representativo da ação do receptor de hidrocarboneto arílico. No citoplasma o AhR forma um complexo unido a diversos elementos: hsp90, p23 e a XAP2 (essa última responsável pela ligação do receptor livre ao citoesqueleto). Após a união com o ligante, ocorre o transporte nuclear e ligação ao translocador nuclear receptor aril hidrocarbononeto (ARNT). O complexo AhR/ARNT liga-se a elementos de resposta xenobiótica (XRE) e ativa a transcrição de diversos genes (Adaptado de: Ikuta, 2009).

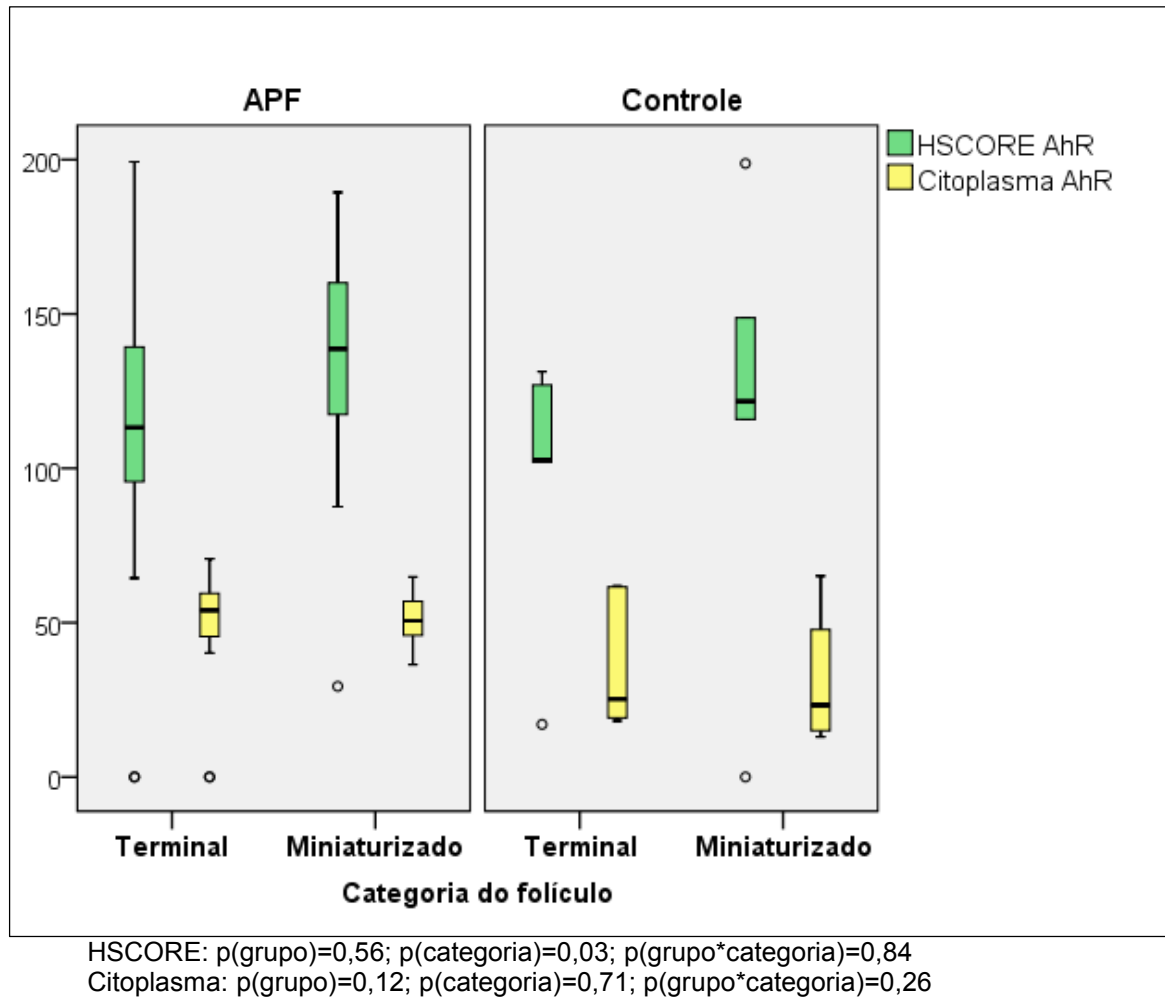
Apêndice 2.

Apêndice 2. Curva ROC da classificação visual em folículos miniaturizados ou terminais, de acordo com o diâmetro máximo do folículo (n=307). Área sob a curva: 0,95 (IC 95% 0,92 a 0,97).

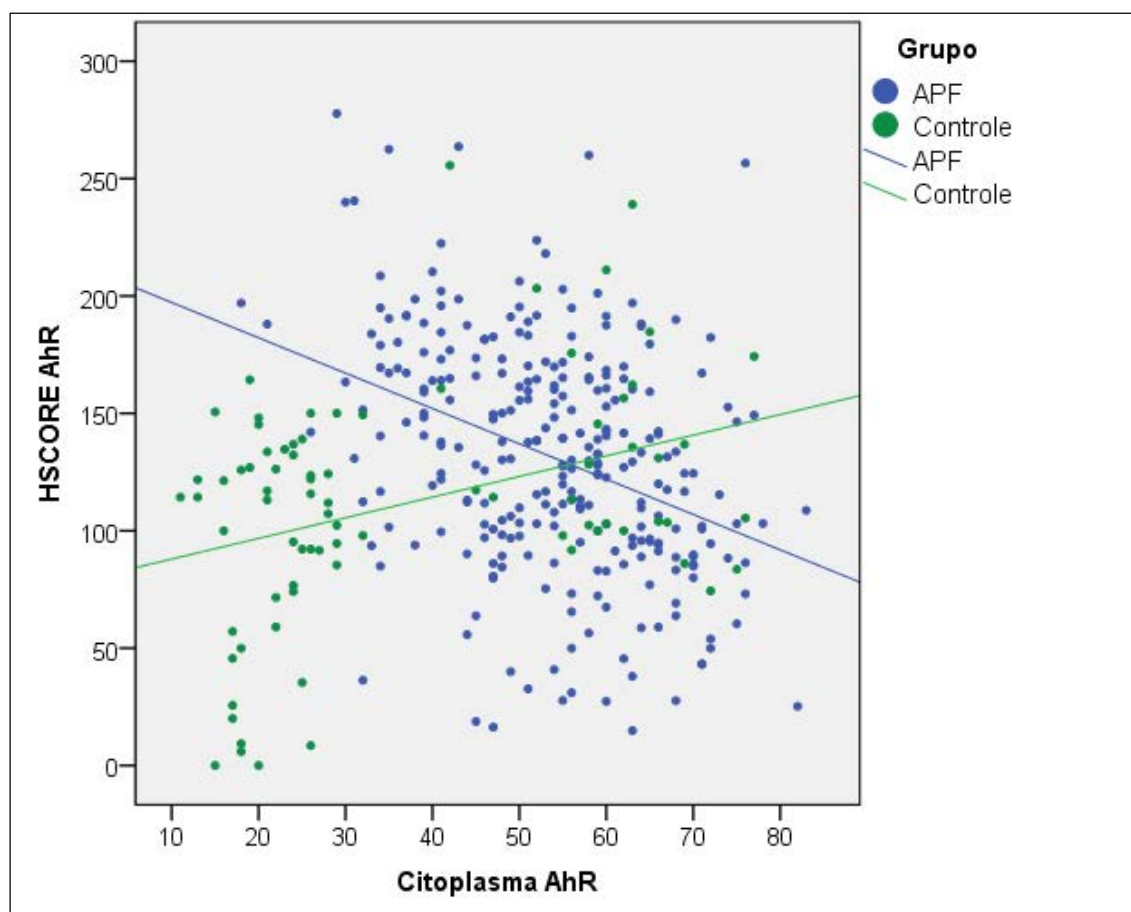
Apêndice 3.

p (grupo)<0,01; p (categoria)<0,01; p (grupo*categoria)<0,01.

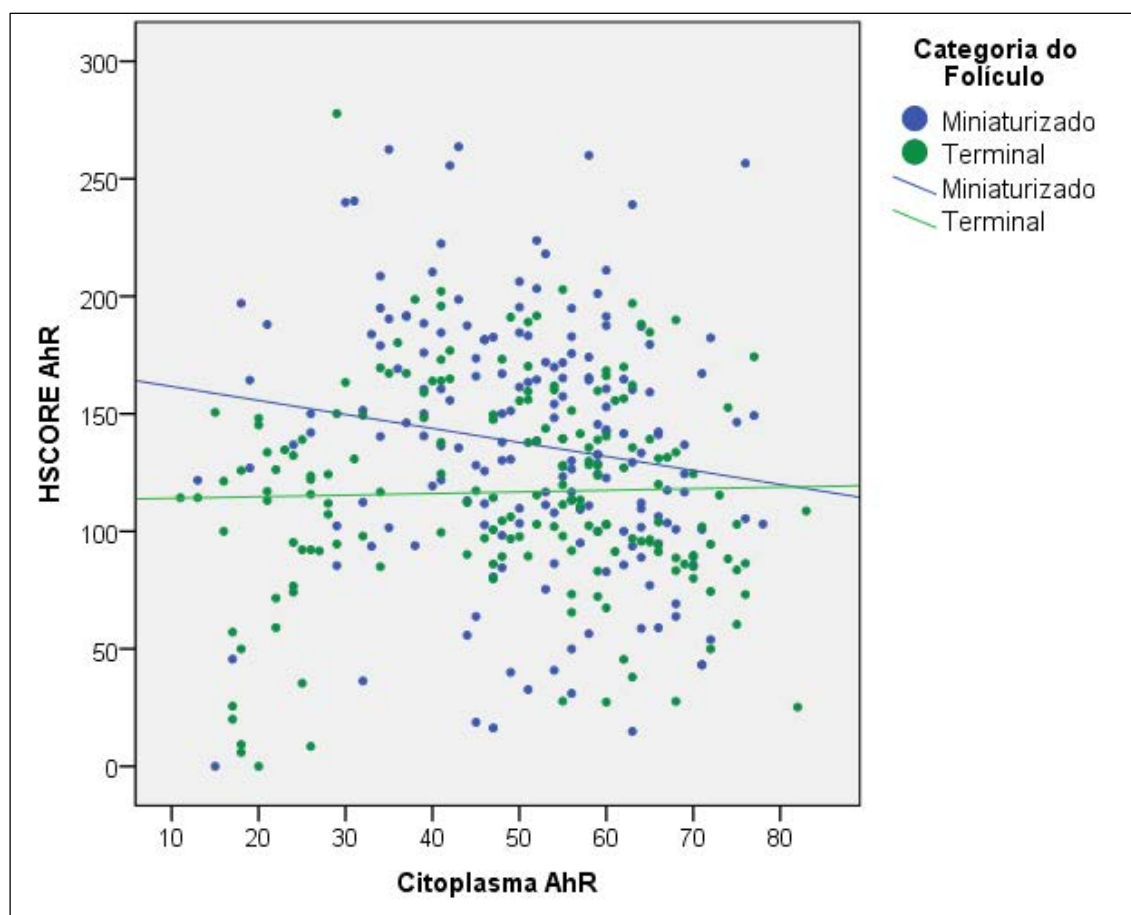
Apêndice 3. Diagrama da distribuição de núcleos marcados pelo TUNEL de acordo com a categoria folicular e o grupo de pacientes (n=17 casos e 5 controles).

Apêndice 4.

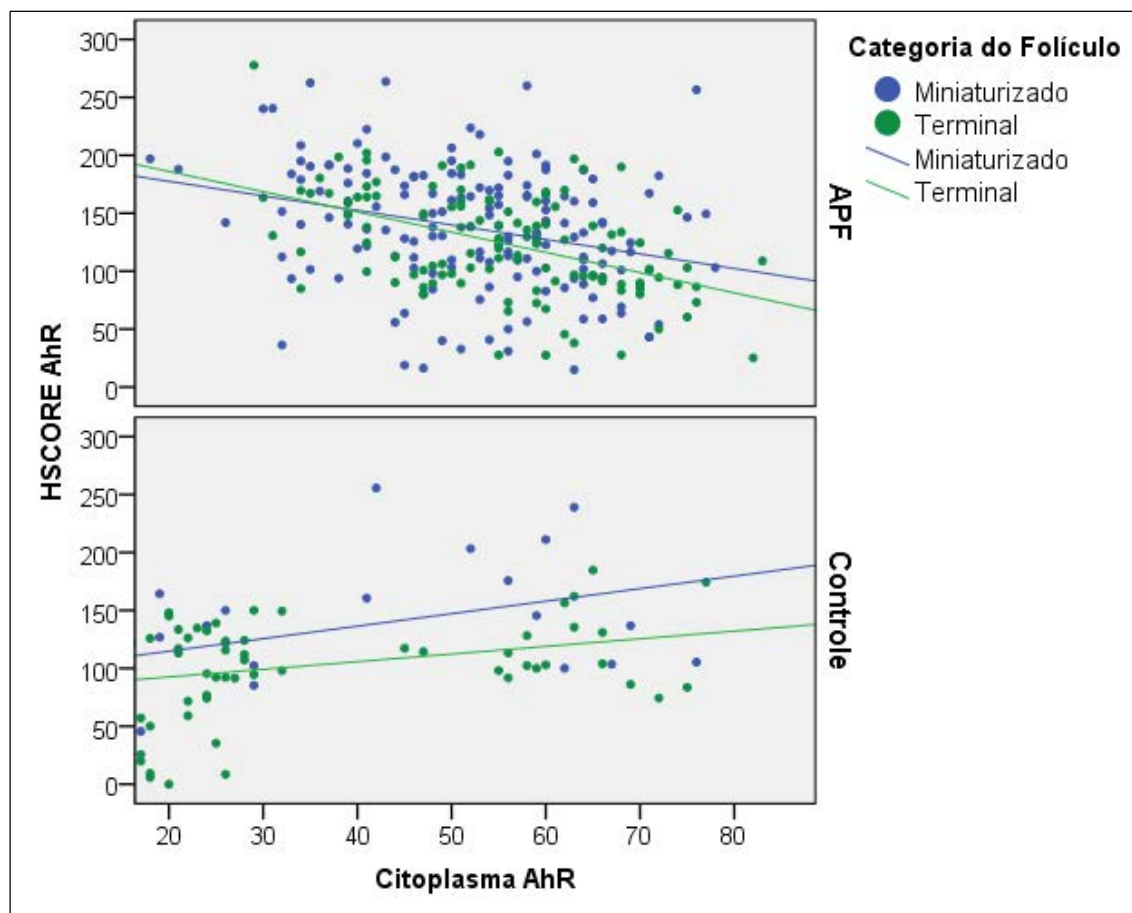
Apêndice 4. Diagrama da distribuição da marcação nuclear e citoplasmática de AhR de acordo com o status folicular e o grupo de pacientes.

Apêndice 5.

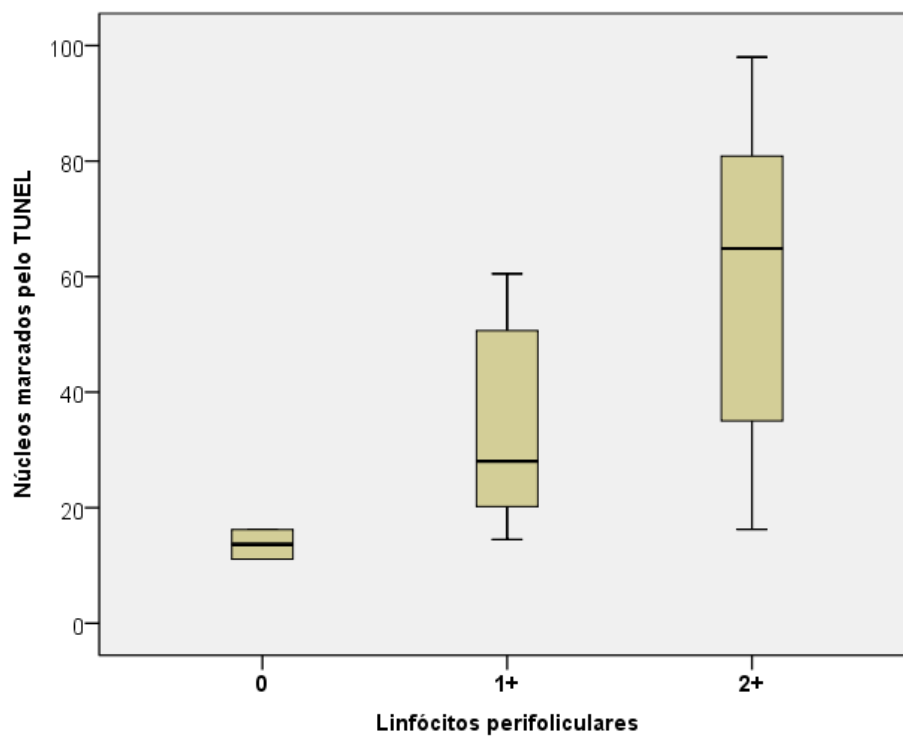
Apêndice 5. Dispersão do HSCORE *versus* marcação citoplasmática do AhR nos folículos entre APF e controles.

Apêndice 6.

Apêndice 6. Dispersão do HSCORE *versus* marcação citoplasmática do AhR nos folículos entre miniaturizados e terminais.

Apêndice 7.

Apêndice 7. Dispersão do HSCORE *versus* marcação citoplasmática do AhR de acordo com a categoria folicular, entre APF e controles.

Apêndice 8.

Apêndice 8. Núcleos marcados pelo TUNEL em comparação com o infiltrado perifolicular ($r_s=0,60$; $p<0,01$).

Anexos

Anexo 1. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Ética
Comitê de Ética em Pesquisa

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de novembro de 2011.

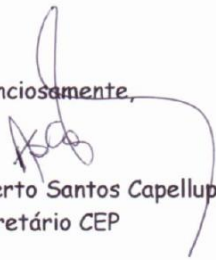
Of. 481/2011

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Hélio Amante Miot
Departamento de Dermatologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Prof. Hélio,

De ordem do senhor coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 4039-2011**) **Análise comparativa da expressão de receptores de dioxina e apoptose nos folículos pilosos de pacientes com alopecia androgenética feminina**, a ser conduzido por Paulo Muller Ramos, orientado por Vossa Senhoria, co-orientado pela Prof^a. Dr^a. Mariângela Esther Alencar Marques, e colaboração da Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07/11/2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário CEP

