UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

MAIRA RENATA MERLOTTO

ESTUDO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NA ALOPECIA DE PADRÃO FEMININO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot
Coorientador: Dr. Paulo Ramos Müller

BOTUCATU
2020

MAIRA RENATA MERLOTTO

ESTUDO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NA ALOPECIA DE PADRÃO FEMININO

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Coorientador: Dr. Paulo Müller Ramos

BOTUCATU

2020

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

Merlotto, Maira Renata.
Estudo da transição epitélio-mesenquimal na alopecia de padrão feminino / Maira Renata Merlotto. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Hélio Amante Miot
Coorientador: Paulo Müller Ramos
Capes: 40100006

1. Cabelo - Doenças. 2. Calvície. 3. Fisiopatologia. 4. Alopecia. 5. Epitélio.

Palavras-chave: Alopecia; Alopecia androgênica; Calvície de padrão feminino; Doenças do cabelo; Fisiopatologia.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista à minha amada família.

Aos meus pais, José Carlos e Lúcia

Pela fonte incondicional e inesgotável de amor, carinho, apoio e incentivo. Vocês são o meu porto seguro.

Às minhas irmãs, Nara e Ana Clara

Minhas eternas companheiras nessa jornada. A admiração, respeito e crescimento mútuos são fontes contínuas de inspiração e motivação em minha vida.

E, especialmente, à minha mãe, por incentivar o sonho da formação acadêmica dos meus avôs Professores, José Stuqui e Maura.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Dr. Hélio Amante Miot,

Meu orientador dessa tese e responsável pela minha formação em Dermatologia desde a residência. Por me aceitar como sua aluna e abrir as portas da vida acadêmica. Aprendi que quase todas as pessoas precisam motivar outros indivíduos a agir por uma outra razão. Os grandes líderes, por outro lado, têm a capacidade de inspirar as pessoas. Hoje, concluo meu trabalho, inspirada pelo médico e professor que é. Levarei sempre imensa gratidão por toda ajuda, respeito e inspiração para minha vida.

Ao Dr. Paulo Müller Ramos,

Que sempre me ensinou com enorme competência e extrema gentileza. Muito obrigada pelo seu comprometimento e disponibilidade em me ajudar, por coorientar com tanto carinho a minha pesquisa e por sua amizade e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente às minhas pacientes, por toda confiança depositada em nosso trabalho.

A Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, minha segunda casa, pela oportunidade de realizar a minha pesquisa.

Aos meus amigos da residência, por todo companheirismo, ajuda na realização das biópsias, apoio e força.

Ao Departamento de Dermatologia. A todos os docentes, médicos contratados, médicos colaboradores, biólogas, fotógrafa, equipe de enfermagem, funcionários. Por todo apoio e aprendizado que sempre recebi.

A minha Banca de Qualificação, Prof. Dr. Juliano V. Schmitt e Prof. Dra. Maria Regina Cavariani Silvares, pela imensa contribuição para finalização do texto.

A Denise Perone, do Laboratório da UNIPEX. A Marcos Franchi, Fernando e Carlos do Laboratório da Patologia da UNESP, pela enorme disponibilidade e carinho para ajudar na confecção das lâminas para o trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial, à Daniele Zorzin, sempre extremamente atenciosa.

A Prof. Dra. Mariângela E. A. Marques, pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Fundo de Apoio à Dermatologia (FUNADERM), pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS 6
RESUMO.....7
REVISÃO DE LITERATURA 9
OBJETIVOS 29
ARTIGO.....30
ANEXOS 55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5αR	5 alfa-redutase
AAG	alopecia androgenética
APF	alopecia de padrão feminino
APS	aparelho pilossebáceo
AS	alopecia senil
BMP	proteína morfogenética óssea
DAPI	4`,6-diamidino-2-phenylindole
Dkk-1	inibidor Dickkopf de WNT, homólogo 1
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FP	folículo piloso
IL	interleucina
MEC	matriz extracelular
PD	papila dérmica
RA	receptor de androgênio
SHH	*sonic hedgehog*
TGF-β	fator de crescimento transformador β

RESUMO

Introdução: Alopecia de padrão feminino (APF) caracteriza-se pela redução gradual da espessura das hastes e da densidade dos fios de cabelo principalmente na região fronto-parietal do couro cabeludo. É a principal causa de alopecia em mulheres adultas e pode gerar grande impacto na qualidade de vida. Além da predisposição genética e do componente hormonal, a APF apresenta outros elementos na sua fisiopatologia que ainda não foram completamente elucidados. Em ensaios clínicos controlados, cerca de 40% das pacientes não apresentam melhora clínica com os tratamentos disponíveis. A melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia propicia o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais específicas e eficazes. O papel de estímulos mesenquimais ao folículo piloso no desenvolvimento e na progressão da APF ainda não foi investigado sistematicamente.

Objetivo: Avaliação dos elementos envolvidos na transição epitélio-mesenquimal da APF, nos seguintes aspectos: quantificação do infiltrado CD4 e CD8, avaliação quantitativa de fibroblastos dérmicos e quantificação da fibrose perifolicular.

Método: Foi conduzido um estudo transversal envolvendo trinta pacientes do gênero feminino portadoras de APF. Avaliaram-se amostras de pele do couro cabeludo (frontal e occipital) que foram processadas para HE, Herovici e imuno-histoquímica para CD4, CD8 e vimentina. As pacientes foram divididas em dois grupos: no grupo horizontal (GH), com 10 pacientes, foram realizados cortes horizontais nas amostras obtidas pela biópsia, e no grupo longitudinal (GL), com 20 pacientes, foram realizados cortes longitudinais. As variáveis foram comparadas de acordo com o grupo de folículos (terminal *versus* miniaturizado) e a gravidade da alopecia, segundo classificação clínica de Sinclair.

Resultados: A miniaturização (>10%) dos fios foi identificada tanto na região frontal, quanto occipital dos casos de APF, havendo diferença mais evidente nos casos mais avançados (61% vs 37%; $p < 0.001$). Houve predomínio do infiltrado CD4 perifolicular, mais intenso nos casos clinicamente mais graves (escore médio 2.9 vs 2.6; $p = 0.004$), assim como fibrose (escore médio 2.6 vs. 2.1; $p = 0.006$) e quantidade de fibroblastos (escore médio 2.2 vs. 2.0; $p = 0.035$). Quanto à estrutura folicular envolvida, CD4, CD8 e fibroblastos apresentaram maiores escores na região do istmo ($p<0.048$), nos casos mais graves.

Conclusões: Casos mais graves de APF apresentam maior infiltrado CD4, fibrose e quantidade de fibroblastos perifoliculares, especialmente, na região do istmo. Caracterizando alterações da transição epitélio mensenquimal na APF.

Palavras-chave: Calvície de Padrão Feminino, Alopecia Androgênica, Inflamação, Miniaturização, Fisiopatologia

REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO

A alopecia de padrão feminino (APF), alopecia androgenética (AAG) feminina ou calvície feminina é a principal causa de alopecia em mulheres adultas. A sua frequência aumenta com a idade, acometendo cerca de 25% das mulheres até os 50 anos e chegando a 40% até os 70 anos.[1]

A APF caracteriza-se como alopecia difusa não cicatricial, decorrente da progressiva miniaturização e posterior redução do número de folículos pilosos, principalmente nas regiões frontal e parietal do couro cabeludo (Figura 1).[2]



Figura 1. Alopecia de padrão feminino. Observa-se rarefação difusa dos cabelos na região frontal e parietal, preservando a linha de implantação anterior (Fonte: Ramos, 2015).

Usualmente, a APF não é acompanhada por sintomatologia sistêmica ou achados clínicos que ultrapassem o couro cabeludo. Em função disso, muitas vezes, sua importância é subestimada. Apesar dos cabelos não exercerem uma função biológica vital, apresentam grande relevância relacionada à aparência e à função de identidade social.[2] A representação do cabelo saudável na vida da mulher implica em sentimentos de autoestima e interação social. Em estudo brasileiro, o temor

relacionado a perder todos os cabelos era tão grande quanto o de se desenvolver um infarto do miocárdio.[3]

MORFOGÊNESE DO FOLICULO PILOSO

O aparelho pilossebáceo (APS) é estrutura cilíndrica bem organizada, multicelular, que produz o pelo e é formada pelo folículo piloso (FP), glândula sebácea e músculo piloeretor.[4]. O corpo humano possui cerca de cinco milhões de FPs, dos quais cerca de 80 a 150 mil estão no couro cabeludo.[4]

A morfogênese do FP tem início na nona semana de gestação, sendo que o seu desenvolvimento é resultado de interações neuroectodérmicas-mesodérmicas e precisa da contribuição das distintas populações de células-tronco do FP: epiteliais, da crista neural e mesenquimais.[5-8] No início do desenvolvimento da pele fetal, focos específicos da epiderme primitiva tornam-se capazes de gerar FP[9], sendo que os requisitos básicos para o desenvolvimento do FP são as interações entre a epiderme e o mesênquima subjacente[5,8]. Esses mecanismos são intrínsecos às trocas epidérmicas-mesenquimais, que permitem a produção do FP, sem necessitar de circuitos hormonais ou neurais intactos[6]. Isso explica por que os FPs podem se desenvolver novamente a partir de fragmentos de cultura de órgãos de pele fetal.[9]

A morfogênese folicular é composta por indução, organogênese e citodiferenciação[10,11]. A indução vem da derme (estágios 0-1), resulta na formação do placoide piloso, seguida da organogênese (estágios 2-5) e citodiferenciação ou maturação (estágios 6-8), com cada fase requerendo interações moleculares específicas.[6]

A agregação de células mesenquimais abaixo da epiderme é um dos primeiros passos na formação do FP[6]. Fibroblastos especializados interagem com a epiderme e se tornam aumentados e alongados induzindo o crescimento focal dos placoides pilosos em áreas definidas, regularmente espaçadas da epiderme sobrejacente[5,6,12]. A formação de placoides pilosos é seguida por condensação de fibroblastos especializados com propriedades indutivas no mesênquima subjacente[4]. As interações entre o placoide piloso epitelial e este condesado mesenquimal induzem a proliferação de ambas as estruturas e estimula o processo de modelagem da papila dérmica (PD) no mesoderma e a invaginação do placoide ectodérmico (Figura 2).[4]

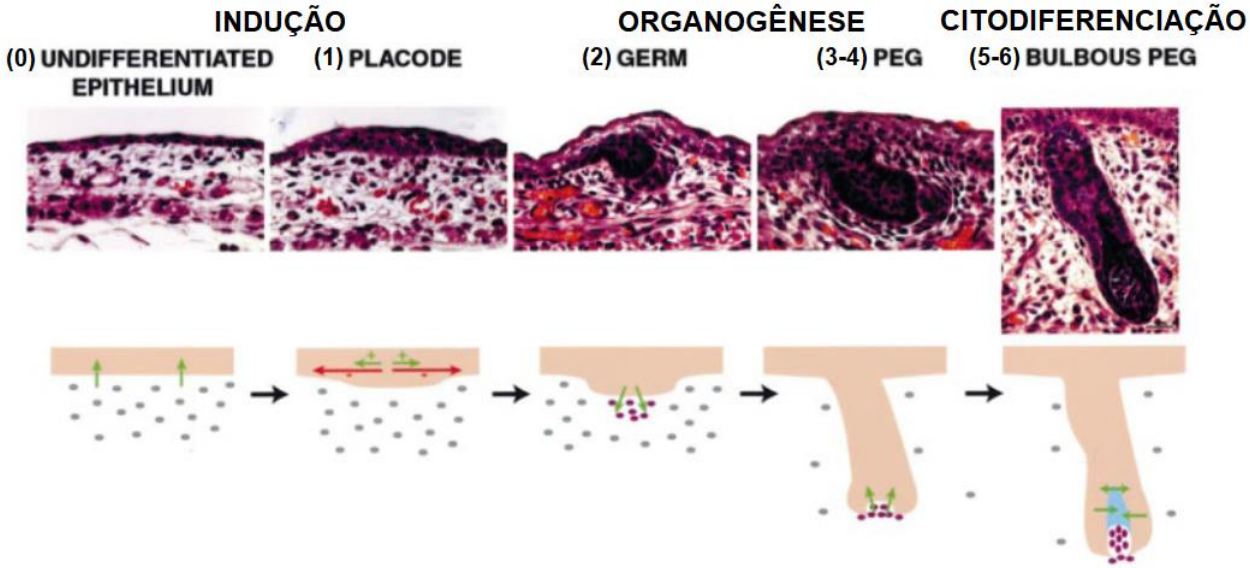


Figura 2. Interação epitélio-mesenquimal no desenvolvimento do FP. (Adaptado de Millar, 2002)

Uma vez que o aglomerado tenha sido formado, sinais epidérmicos são necessários para induzir o desenvolvimento do “centro de comando mesenquimal” na PD, iniciando a fase de organogênese. Apesar de inicialmente o crescimento epitelial ser direcionado para baixo, ele é revertido de maneira ascendente, em resposta a sinais gerados pela PD, pela via Wnt e proteína morfogenética óssea (BMP).[4]

Durante a organogênese, ocorre a inervação alvo-específica do FP, angiogênese, início da formação da unidade pigmentar[13]. O começo da terceira fase, a citodiferenciação do folículo, ocorre em torno da 11ª semana de gestação e coincide com o início da geração de melanina. Também ocorre a diferenciação de queratinócitos em sebócitos, no epitélio superior do FP.

Após a conclusão de seu desenvolvimento, cada FP anágeno está ativamente produzindo hastes pilosas, e deverá passar por um curso completo de transformações, que começa com a regressão apoptose-dirigida (catágeno), seguida por um período de quiescência relativa (telógeno).[14]

Os FPs humanos tendem a se organizar em aglomerados de três ou mais FPs, denominados “unidades foliculares”. Em uma biópsia do couro cabeludo, por *punch* 4 mm, seccionada horizontalmente, pode-se encontrar em torno de 12-14 unidades foliculares.[15]

Em um corte longitudinal, são distinguidas três diferentes porções do FP, denominadas: infundíbulo (desde o orifício folicular até a desembocadura da glândula sebácea), istmo (delimitado superiormente pela glândula sebácea e inferiormente pela

inserção do músculo eretor do pelo) e segmento inferior (abaixo do músculo eretor).[16] (Figura 3)

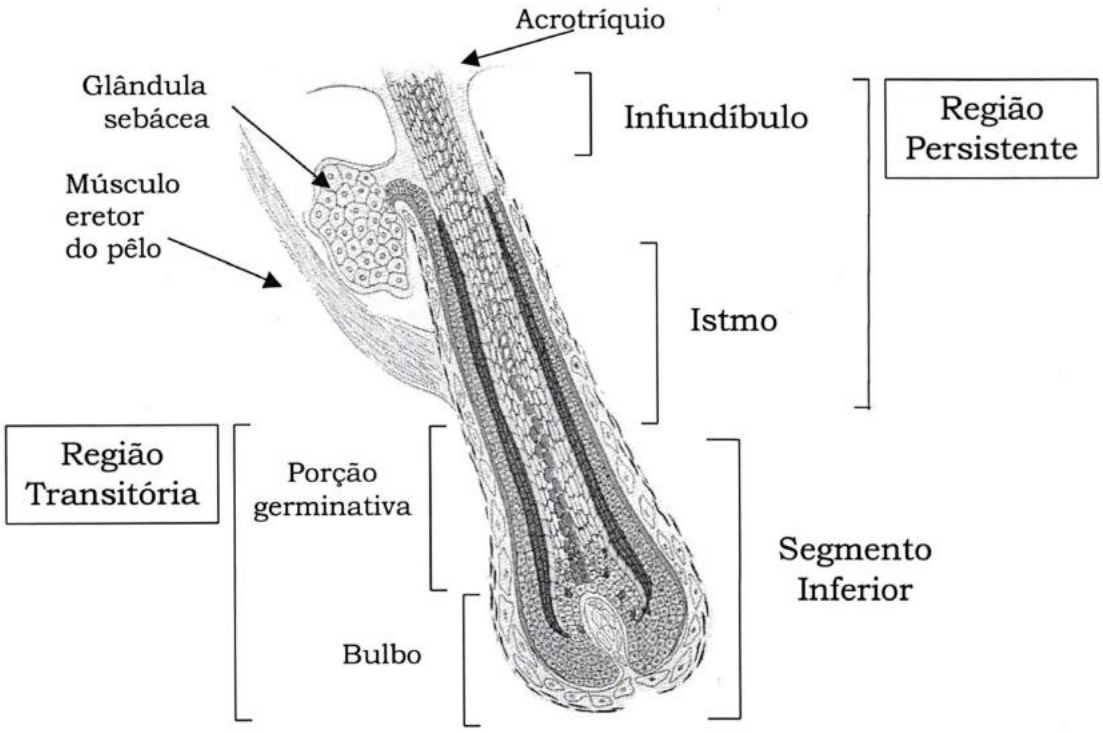


Figura 3. Diagrama representando as regiões anatômicas do FP (Adaptado de Whiting, 1996).

O *bulge* ou protuberância é a parte mais inferior da região dita “permanente” do FP durante o ciclo capilar, é considerado o principal sítio de células progenitoras, importantes para regeneração e para o ciclo folicular.[11]

No segmento inferior do FP localiza-se o bulbo, parte mais espessa e profunda, que circunda a PD contendo células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos[11] (Figura 4). A PD é composta por fibroblastos especializados, acredita-se que tais fibroblastos produzam sinais que induzam a divisão das células da matriz.[4]

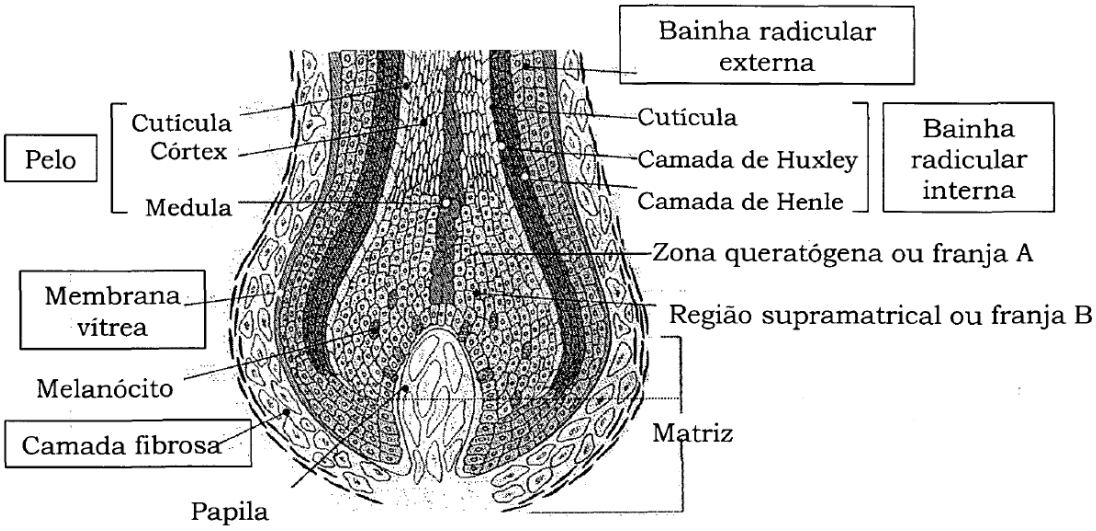


Figura 4. Diagrama representando o segmento inferior do FP (Adaptado de Whiting, 1996).

Existem muitas moléculas que controlam o desenvolvimento do FP através da comunicação entre a epiderme e a derme. A via de sinalização Wnt é fundamental no desenvolvimento do FP; β-catenina atua à jusante na via do Wnt, promovendo a formação dos placoides pilosos, após o sinal dérmico inicial. Dentre outras, incluem a proteína *sonic hedgehog* (SHH), bem como membros do fator de crescimento transformador β (TGF-β), BMP, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e as famílias do fator de necrose tumoral (TNF).[4-8]

São descritos fundamentalmente dois tipos de cabelos, o terminal e o velo[17]. Quanto ao aspecto anatômico e tipo histológico esses cabelos são muitos parecidos, sendo sua diferença básica o tamanho. Os velos apresentam diâmetro ≤ 0,03 mm e os terminais ≥ 0,06 mm. Entre essas duas medidas situam-se os cabelos intermediários.

O pelo velo é pequeno, mede geralmente menos de 2 cm, macio, pouco pigmentado e não apresenta músculo piloeretor. O pelo velo pode se transformar em terminal, como ocorre na barba do homem na puberdade. Uma verdadeira transformação de pelo terminal em velo não parece de fato ocorrer. No caso da alopecia androgenética (AAG) ocorre uma miniaturização dos pelos terminais, resultando em um aspecto semelhante ao pelo velo[13]. O fio miniaturizado assemelha-se muito ao fio velo, porém não é um velo verdadeiro, pois, apesar de fino, apresenta músculo piloeretor desenvolvido, diferentemente do velo que apresenta músculo diminuído ao ausente.

Os FPs se desenvolvem de forma periódica padronizada, tenho sido propostos vários modelos para explicar o surgimento espontâneo de tais padrões.[10-13]

O ciclo biológico dos FPs 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 (quiescência relativa). Ao fim da fase telógena, o fio de cabelo original desprende-se (fase exógena ou teloptose) sendo reposto por um novo fio em fase inicial de crescimento[18]. Normalmente, no couro cabeludo, a fase anágena dura de 2-8 anos, a catágena, 2-3 semanas e a telógena, cerca de 3 meses.

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]

FISIOPATOLOGIA DA APF

A APF envolve miniaturização progressiva dos FPs e, subsequentemente, a conversão dos folículos terminais em miniaturizados. Gradativamente, ocorre diminuição da densidade capilar nas áreas acometidas. A fisiopatologia da APF não é ainda completamente elucidada. Há evidências de elementos genéticos, hormonais e, possivelmente, ambientais envolvidos.[19-21]

Na APF ocorre diminuição da duração da fase anágena e miniaturização da PD (afinamento do fio). Gradualmente, ocorre substituição de fios espessos e pigmentados por fios miniaturizados (Figura 5). Além disso, ocorre atraso entre o fim do telógeno e o início de novo anágeno.[2] Essa fase em que o FP fica vazio é conhecida como fase quenógena.[22]

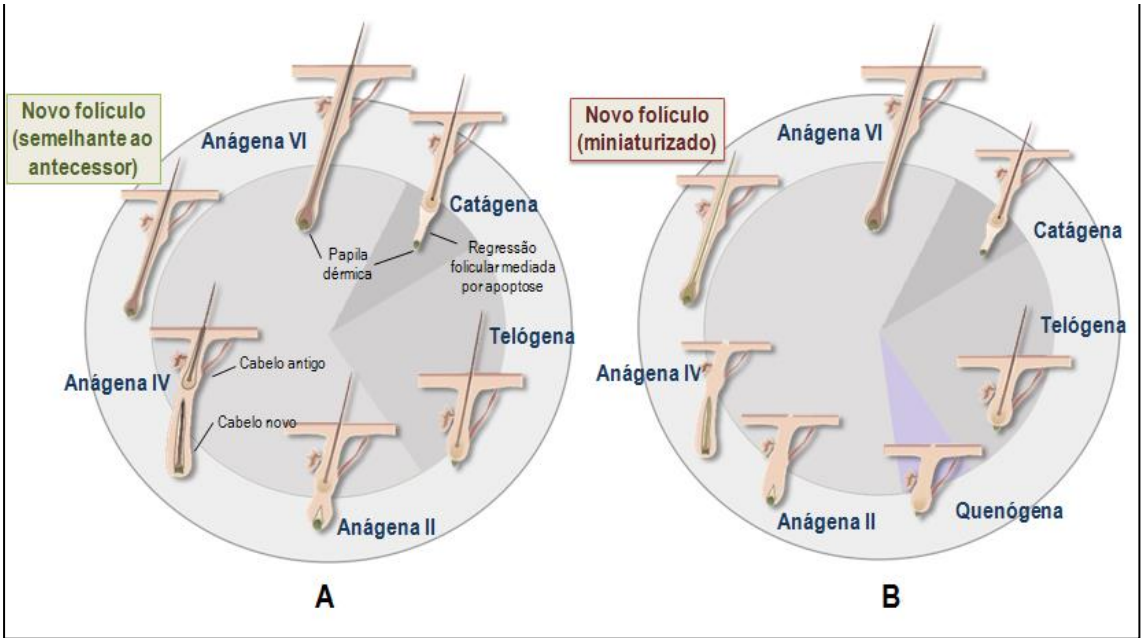


Figura 5. Esquemas representativos do ciclo do pelo. A. Ciclo normal do folículo. B. Alterações que ocorrem na APF: encurtamento da duração da fase anágena, aumento do período de latência (fase quenógena) e miniaturização dos folículos. (Fonte: Ramos, 2015)

O FP 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 precoce da fase catágena.[24]

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.[22-24]

Fator hormonal

A princípio, acreditava-se que a AAG masculina fosse uma entidade exclusivamente andrógeno dependente. Observou-se que eunucos e homens castrados antes de atingir a adolescência não desenvolviam alopecia. Porém, a administração de testosterona induziu surgimento de alopecia nos indivíduos com história familiar de alopecia[11]. Essas observações em conjunto indicavam que a testosterona, ou algum de seus metabólitos, estavam envolvidas no desenvolvimento da alopecia em indivíduos com predisposição genética.[26]

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.[2,27]

A observação de que homens com deficiência genética de 5α-retudase (5αR) tipo 2 não desenvolviam alopecia sugeriu a diidrotestosterona (DHT) como principal andrógeno envolvido no desenvolvimento da AAG.[28]

A 5αR é enzima que converte a testosterona no metabólito DHT. Existem dois tipo de 5αR, tipo 1 e 2. A 5αR tipo 1 se expressa predominantemente em tecidos extraprostáticos, como pele e fígado, e a tipo 2, nos tecidos genitais e tem afinidade por substratos esteroides.[29]

A miniaturização do FP 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. O androgênio ligado ao RA leva a transcrição dos genes responsáveis pela sua ação biológica nas células alvo.[2]

As evidências que indicam os androgênios como fatores determinantes para surgimento de AAG baseiam-se em estudos em homens. A importância dos androgênios como causadores da alopecia na mulher foram inicialmente presumidos pelo entendimento que, apesar das diferenças clínicas entre os gêneros, tratava-se da mesma entidade. Porém, o papel dos andrógenos na APF é pouco claro, por isso recomenda-se o termo “alopecia de padrão feminino” ao invés de “alopecia androgenética feminina”.[30,31]

O bloqueio da 5αR tipo 2 é eficaz no tratamento da AAG masculina, o que corrobora 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.[32]

A APF e a AAG masculina compartilham uma via comum final de regressão folicular, mas o conhecimento atual sugere que a etiologia não é necessariamente a mesma em ambos os sexos. Outros fatores, não hormonais, que ainda não foram identificados, provavelmente desempenham papel no desenvolvimento da APF.

Microinflamação

A implicação de uma inflamação perifolicular microscópica na AAG emergiu de vários estudos[15,19,33]. Mahé *et al.*[19] propuseram o termo “ microinflamação”, porque o processo envolve um curso lento e sutil, caracterizado por um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário leve a moderado na região peri-infundibular, em contraste com o

processo inflamatório intenso e destrutivo nas alopecias inflamatórias cicatricias clássicas (Figura 6). A frequência deste processo é variável.

Em 1993, Whiting avaliou a presença do infiltrado inflamatório em 106 homens com AAG 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.[15]

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

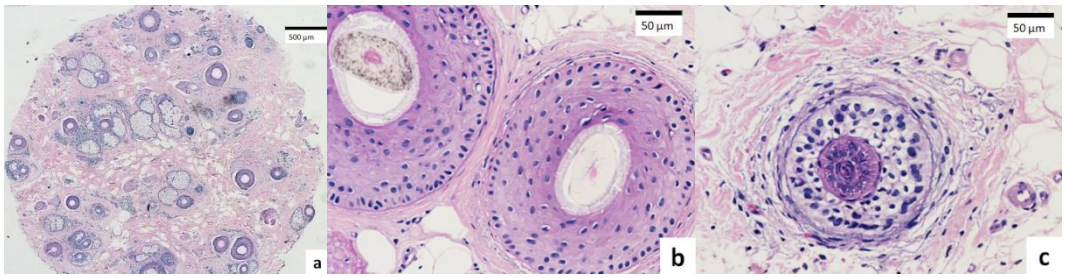


Figura 6. Exame histopatológico de APF. A. Corte transversal evidenciando grande variabilidade no diâmetro dos folículos. B. Detalhe folículo terminal. C. Detalhe de folículo miniaturizado, fibrose perifolicular e infiltrado inflamatório mononuclear esparso (HE 40x). (Fonte: Ramos, 2016)

Interações mesenquimais

Os fibroblastos dérmicos são células mesenquimais responsáveis pela síntese de colágeno e glicosaminoglicanos, componentes da matriz extracelular (MEC), que têm função de suporte e estrutura da pele.[34]

As suas funções vão além de apenas produzir material para MEC. Uma de suas funções mais conhecidas é a produção de diversos fatores de crescimento e proteases que promovem e regulam o processo de cicatrização de feridas. Além disso, apresentam importante papel nas diferenças regionais das características da pele em nosso organismo, como nas áreas de predominância de fios terminais (couro cabeludo e barba) e de fios miniaturizados (pele glabra).[34]

Jahoda[35], em estudo em humanos demonstrou que fibroblastos dérmicos cultivados do couro cabeludo geravam crescimento de longos fios terminais quando transplantados para o braço, apontando a PD mesenquimal como importante centro de sinalização, capaz de induzir a formação de FP *de novo* após transplante.

Utilizando o folículo de vibrissa de roedor como modelo, estudos de transplante demonstraram que a PD é de primordial importância no crescimento do cabelo[36]. As papilas dérmicas podem induzir o crescimento capilar quando implantadas na epiderme de outras áreas[37,38] e várias associações entre a PD e epiderme foram descritas, demonstrando profunda influência da PD na epiderme, incluindo a formação de novos FPs.[39]

Quando cultivadas em cultura, as células da PD apresentam características morfológicas e comportamentais singulares em comparação com as células do tecido conjuntivo de outras fontes da pele[40], podem induzir o crescimento de cabelo quando implantadas em folículos que, de outra forma, não o fariam, como, por exemplo da pele escrotal, segundo estudo experimental com camundongos realizado por Oliver[37]. Esses dados evidenciam que fatores mesenquimais externos ao FP podem ser determinantes na sua atividade e capacidade de regeneração.[41]

As células da PD são um componente essencial de sinalização dentro do nicho de células-tronco epiteliais. A interação epitelial-mesenquimal é indispensável não apenas para a morfogênese FP embrionário, mas também para o ciclo capilar pós-natal.[42-45]

Para a interação epitélio-mesenquimal folicular pós-natal, as células da PD liberam ligantes de sinalização, como TGF-β2 e FGF-7[46], para ativar os FPs para um novo ciclo capilar, e sinais das células epiteliais também são necessários para a entrada adequada na fase anágena[47]. Depois que os FPs atingem a fase anágena madura, a PD se comporta como um nicho instrutivo, regulando a proliferação e a diferenciação celular ordenada para alongamento adequado do eixo capilar e manutenção da estrutura do bulbo capilar.[48]

A ativação contínua da sinalização da via canônica, ou via dependente de Wnt/β-catenina, na PD, por meio da interação epitelial-mesenquimal é indispensável para a progressão anágena[49]. Durante a fase catágena, a PD também é essencial para a recessão do cilindro epitelial através da apoptose controlada / morte celular[42]. Além do ciclismo fisiológico, a PD também pode instruir o processo de reparo da fase anágena, para evitar a entrada em catágena quando as células-tronco são lesadas, por exemplo, por quimioterapia e radioterapia.[50,51]

O diâmetro do folículo é diretamente determinado pelo tamanho da PD.[52] A constante relação geométrica entre o tamanho da PD e o tamanho da matriz capilar

sugere que o tamanho da PD determina o tamanho do bulbo capilar e, finalmente, o eixo capilar produzido.[26,53]

O ciclo capilar é acompanhado por modificações notórias da MEC. Entre o fim do telógeno e o início de um anágeno, ocorre desenvolvimento da MEC, que se torna rica em proteínas da membrana basal e proteoglicanos. Portanto, durante a fase anágena, a PD é circundada por fibroblastos especializados. Já na fase catágena, a PD é deixada para trás do FP em regressão, e sua MEC começa a se degradar. Quando finalmente o FP atinge o telógeno, a PD é um agregado celular simples, sem MEC. A partir desses dados, alguns autores acreditam que alterações no volume da PD podem ser decorrentes de alterações no número de células dentro da PD, ou de alterações na quantidade relativa de MEC, ou de ambas.[54,55] (Figura 7)

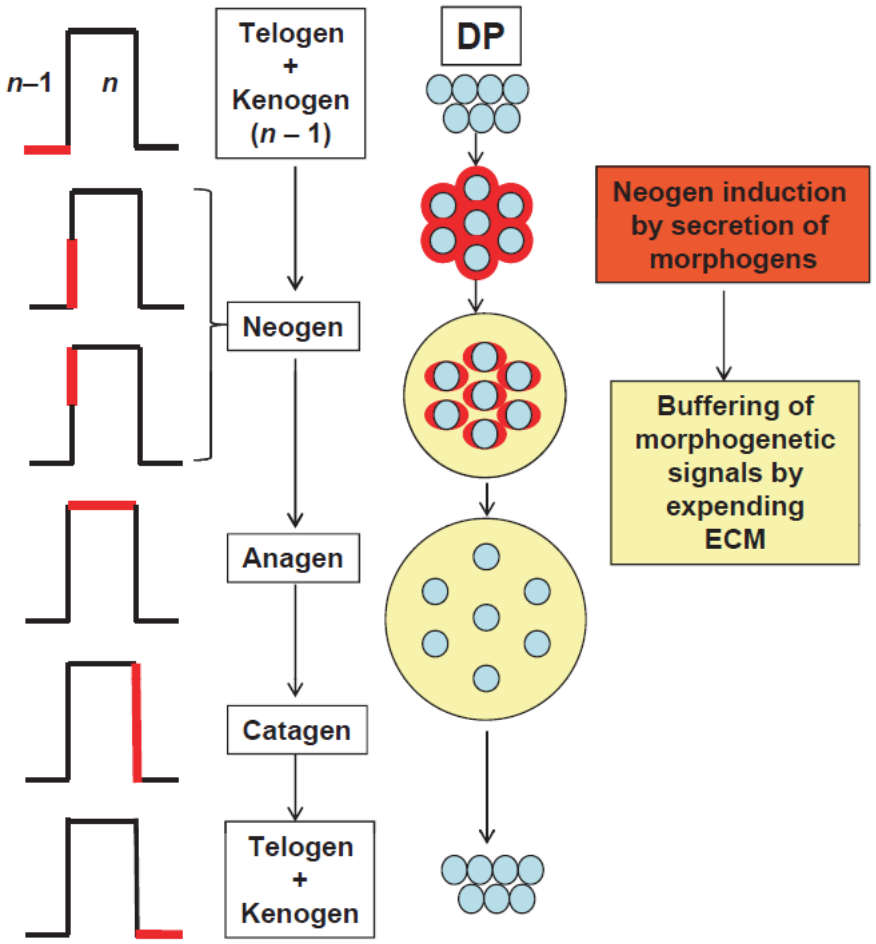


Figura 7. Dinâmica da PD e interações. Na coluna da esquerda, representadas as fases sucessivas do comportamento dos FPs humanos. O destaque vermelho indica a fase correspondente aos desenhos da PD associados (na coluna da direita). Nesse modelo, a competição entre morfógenos e a matriz extracelular (MEC) postula-se na secreção para regular a duração e extensão da fase que precede a anágena. A secreção de morfógenos corresponde à área vermelha ao redor das células da PD (representada em azul), enquanto a MEC é representada em amarelo. (Extraído de Bernard, 2012)

De forma geral, o FP é uma estrutura que apresenta um ciclo regenerativo a partir da atividade das *stem cell* foliculares. A perda do processo de regeneração pode decorrer de alterações das *stem cell* ou da interferência da interação epitélio-mesenquimal que suporta o processo regenerativo.[45]

Rompolas et al.[43] estudaram a participação do mesênquima na indução de regeneração capilar, através da avaliação de imagens ao vivo do comportamento de células-tronco e da progênie na regeneração fisiológica do FP, utilizando para estudo uma linha de camundongos transgênica que marca todos os núcleos epiteliais da pele.

Durante os primeiros estágios da regeneração, a proliferação é iniciada pela progênie das células-tronco, que sofre uma rápida expansão descendente (Figura 8).

A quantificação sistemática da localização e do eixo das divisões de vários registros mostra que a maioria das divisões ocorre na parte inferior do folículo, na interface entre a progênie e o mesênquima no início de um novo crescimento (Fig. 8.d).

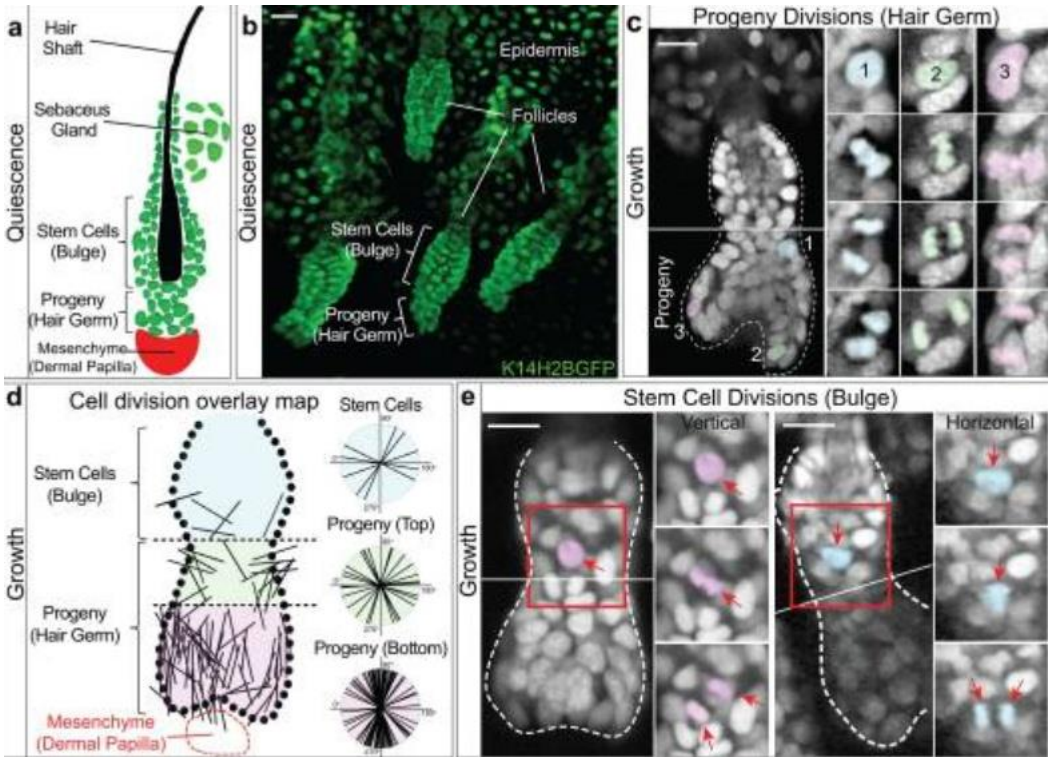


Figura 8. Divisões celulares espacialmente no FP no início de um novo ciclo capilar. A. Um FP quiescente. Populações distintas de células que participam da regeneração capilar, incluindo células-tronco, progênie e mesênquima, residem em compartimentos anatômicos definidos do folículo capilar. B. Uma reconstrução tridimensional de FPs vivos inativos, a partir de seções ópticas seriadas adquiridas por microscopia de varredura a laser de dois fótons. Os núcleos epiteliais (verdes) são visíveis usando a proteína de fusão H2B-GFP é acionada pelo promotor de queratina 14. C. Exemplo de divisão celular da progênie. Uma única seção óptica de um FP vivo (painel esquerdo) e vistas ampliadas (direita) de três núcleos no compartimento da progênie que sofrem mitose em tempo real (direita). D. As localizações e os eixos das divisões celulares foram quantificados a partir de vários FPs na fase inicial do crescimento. E. Dois exemplos de divisões de células-tronco verticais (painel esquerdo) e horizontais (painel direito). Uma única fatia óptica de folículos capilares vivos (esquerda, inserções) e vistas ampliadas de núcleos no compartimento de células-tronco (direita, inserções) em mitose. 20 µm. (Fonte: Rompolas, 2012)

Durante a regeneração, a parte inferior do FP sofre uma grande reorganização à medida que o mesênquima transita de extrudado do epitélio para abrangido por ele[43] (Figura 8). Isso levou a propor que as mudanças na arquitetura dos tecidos possam depender de processos celulares adicionais, além das divisões celulares, e fornece a hipótese de um mecanismo de crescimento capilar não identificado anteriormente,

além da divisão celular, que possa estar envolvido com as interações epitelio-mesenquimais e alterações na MEC.

Para determinar se a ablação mesenquimal alterava a composição molecular e celular do FP, foram coletadas amostras de pele contendo folículos que sofreram ablação mesenquimal e analisadas sete dias após. Dados histológicos e de imunofluorescência indicaram que a PD mesenquimal é necessária para o início do crescimento capilar e ressaltaram a importância das interações epitélio-mesenquimais para a ativação e regeneração de células-tronco.[43]

A partir de tais dados, inferimos que possíveis alterações na transição epitélio-mesenquimal possam intervir na fisiologia do FP e atuar no desenvolvimento de alopecias não cicatriciais, como a APF. A possível relação entre estímulos mesenquimais e o desenvolvimento da APF ainda não foi investigado sistematicamente.

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 de fios).[57,58]

Clinicamente, APF pode se apresentar de três maneiras[59]. O padrão de rarefação difusa da região biparietal superior e vértice preservando a linha de implantação anterior pode ser classificado utilizando-se duas escalas. A de Ludwig,[59] dividida em três graus, em que o primeiro apresenta uma leve rarefação até o terceiro em que ocorre ausência total dos fios na área acometida. Apesar de amplamente utilizada, essa escala apresenta limitações por impossibilitar uma classificação mais precisa de estágios intermediários. 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 9).[32]

Outra manifestação é o afinamento da região parietal superior com acentuação frontal com formato triangular que assemelha-se a forma de uma árvore de Natal[60]. Uma terceira manifestação é alopecia da região bitemporal e vértice que é mais comumente observada em homens. Quando ocorre em mulheres, hiperandrogenismo deve ser excluído, principalmente tumores virilizantes.[61]

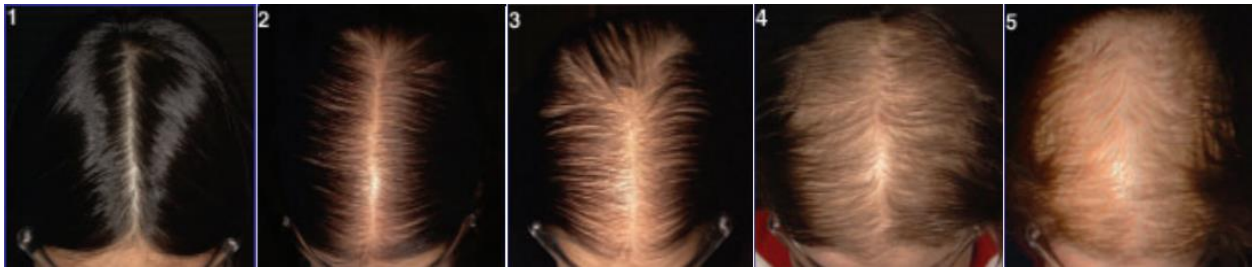


Figura 9. Classificação clínica de Sinclair. (Adaptado de Sinclair, 2005)

Em ensaios clínicos controlados, cerca de 40% das pacientes não apresentam melhora clínica com os tratamentos disponíveis.[32] A melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia propicia o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais específicas e eficazes.

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

1. Fabbrocini G, Cantelli M, Masara A, et al. Female pattern hair loss: a clinical, pathophysiologic, and therapeutic review. Int J Women Dermatol 2018; 4(4):203-211.
2. Ramos PM and Miot HA. Female Pattern Hair Loss: a clinical and pathophysiological review. An Bras Dermatol 2015; Jul-Aug; 90(4): 529–543.
3. Penha MA, Santos PM, Miot HA. Dimensioning the fear of dermatologic diseases. An Bras Dermatol 2012; 87:796-9.
4. Millar, SE. Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development. J Invest Dermatol 2002; 118:216-25.
5. Schmidt-Ulrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. Bioessays 2005;27(3):247-61.
6. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The hair follicle as a dynamic miniorgan. Curr Biol 2009;19(3): R132-42.
7. Glover JD, Wells KL, Matthaus F, et al. Hierarchical patterning modes orchestrate hair follicle morphogenesis. PLoS Biol 2017;15(7): e2002117.
8. Christiano AM. Epithelial stem cells: stepping out of theis niche. Cell 2004;118(5):530-32.
9. Stenn KS, Paus R. Controls of hair cycling. Physiol Rev 2001;81(1):449-94.
10. Wang Q, Oh JW, Lee HL, et al. A multi-scale model for hair follicles reveals heterogeneous domains driving rapid spatiotemporal hair growth patterning. Elife 2017;6.
11. Kealey T, Philpott M, Guy R. The regulatory biology of the human pilosebaceous unit. Baillieres Clin Obstet Gynaecol 1997;11(2):205-27.
12. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. N Engl J Med 1999;341(7):491-97.
13. Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, et al. A murine model for inducing and manipulating hairfollicle regression (catagen): effects of dexamethasone. J Invest Dermatol 1994 Aug;103(2):143-7.
14. Lehman JM, Laag E, Michaud EJ, et al. An essential role for dermal primary cilia in hair follicle morphogenesis. J Invest Dermatol 2009; 129:438-48.
15. 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.
16. Whiting DA, Howsden, FL. Normal hair. Color Atlas of differencial diagnosis of hair loss. Canfield, 1996. P.02-17.
17. Randall VA. Androgens and hair growth. Dermatol Ther 2008; 21:314-28.
18. Alonso, L, Fuchs, E. The hair cycle. J Cell Science 2006; 119: 391-93.
19. Mahe YF, Michelet JF, Billoni NB, et al. Androgenetic alopecia and microinflammation. Int J Dermatol 2000; 39: 576-84.
20. Messenger AG. Hair through the female life cycle. Br J Dermatol 2011;165 Suppl 3:2-6.
21. Hillmer AM, Flaquer A, Hanneken S, et al. Genome-wide scan and fine-mapping linkage study of androgenetic alopecia reveals a locus on chromosome 3q26. Am J Hum Genet 2008; 82:737–743.
22. Rebora A, Guarrera M. Kenogen. A new phase of the hair cycle? Dermatology 2002; 205:108-10.

23. Botchkareva NV, Kahn M, Ahluwalia G, et al. Survivin in the human hair follicle. J Invest Dermatol 2007;127: 479-82.
24. Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. Apoptosis in the hair follicle. J Invest Dermatol 2006;126: 258-64.
25. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, et al. Steroid 5α-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. Science 1974; 186:1213-5.
26. Jahoda CAB. Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. Exp Dermatol 1998; 7: 235-48
27. Sawaya ME, Price V, Harris KA, et al. Human hair follicle aromatase activity in female with androgenetic alopecia. J Invest Dermatol 1990; 94: 575.
28. Trüeb RM. Molecular mechanisms of androgenic alopecia. Exper Gerontol 2002; 37: 981-90.
29. Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, et al. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha - reductase isozyme expression. J Clin Invest 1993; 92(2): 903-10.
30. Olsen EA, Messenger AG, Shapiro J, et al. Evaluation and treatment of male and female pattern hair loss. J Am Acad Dermatol 2005;52(2):301-11.
31. Trüeb RM. Systematic approach to hair loss in women. J Dtsch Dermatol Ges 2010;8(4):284-98.
32. Sinclair R, Wewerinke M, Jolley D. Treatment of female pattern hair loss with oral antiandrogens. Br J Dermatol 2005; 152:466-73.
33. Jaworsky C, Kligman AM, Murphy GF. Characterization of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: implication for pathogenesis. Br J Dermatol 1992; 127:239–46.
34. Thangapazham R et al. Alteration of Skin Properties with Autologous Dermal Fibroblasts. Int J Mol Sci 2014; 15,8407-27.
35. Jahoda CAB, et al. Trans-gender induction of hair follicles. Nature 1999; 402,33.
36. Oliver, RF & Jahoda, CAB. in Hair Research (eds Orfanos, C. E., Montagna, W. & Stuttgen, G.) 18–24 (Springer, Berlin, 1981).
37. Oliver RF. J Embryol exp Morph 1967; 18, 43–51.
38. Ibrahim, L & Wright, EA. Nature 1977; 265, 733–34.
39. Oliver RF. J Embryol exp Morph 1970; 23, 219–36.
40. Jahoda, CAB. & Oliver, RF. J Embryol exp Morph 1984; 79, 211-24.
41. Jahoda CA, Horne KA, Oliver RF. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. Nature 1984; 311, 560–62.
42. Mesa KR, et al. Niche-induced cell death and epithelial phagocytosis regulate hair follicle stem cell pool. Nature 2015;522(7554):94–7.
43. Rompolas P, et al. Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration. Nature 2012;487(7408):496–9.
44. Müller-Röver S, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. J Invest Dermatol 2001; 117:3–15.
45. Yu Z, et al. Hoxc-dependent mesenchymal niche heterogeneity drives regional hair follicle regeneration. Cell Stem Cell 2018;23(4):487–500 e6.
46. Sennett R, Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. Semin Cell Dev Biol 2012;23(8):917–27.
47. Greco V, et al. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. Cell Stem Cell 2009;4(2):155–69.
48. Myung PS, et al. Epithelial Wnt ligand secretion is required for adult hair follicle growth and regeneration. J Invest Dermatol 2013;133(1):31–41.

49. Yang H, et al. Epithelial-Mesenchymal micro-niches govern stem cell lineage choices. Cell 2017;169(3):483–96 e13.
50. Enshell-Seijffers D, et al. Beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. Dev Cell 2010;18(4):633–42.
51. Huang WY, et al. Mobilizing transit-amplifying cell-derived ectopic progenitors prevents hair loss from chemotherapy or radiation therapy. Cancer Res 2017;77(22):6083–96.
52. Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. Trends Mol Med 2001; 7:293-301.
53. Cranwell W, Sinclair R. Male Androgenetic Alopecia. [Updated 2016 Feb 29]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
54. Bernard, BA. The human hair follicle, a bistable organ? Exp Dermatol 2012; 21, 401-3.
55. Malgouries S, Thibaut S, Bernard BA. “Proteoglycan expression patterns in human hair follicle”. Br J Dermatol 2008; 158(2):234–42.
56. Huang WY, et al. Anagen hair follicle repair: timely regenerative attempts from plastic extra-bulge epithelial cells. Exp Dermatol 2019;28(4):406–12.
57. Birch MP, Messenger JF, Messenger AG. Hair density, hair diameter and the prevalence off female pattern hair loss. Br J Dermatol 2001; 144:297-304.
58. Birch MP, Messenger AG. Genetic factors predispose to balding and non-balding in men. Eur J Dermatol 2001; 11:309-14.
59. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occuring in the female sex. Br J Dermatol 1977; 97:247-54.
60. 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.
61. Redler S, Messenger AG, Betz RC. Genetics and other factors in the aetiology of female pattern hair loss. Exp Dermatol 2017; 26:510–517.
62. Krause K, Foitzik K. Biology of Hair Follicle: The Basics. Semin Cutan Med Surg 2006; 25: 2-10.
63. Whiting DA. The Structure of the Human Hair Follicle. Light Microscopy of Vertical and Horizontal Section of Scalp Biopsies. Pfizer, Canfield Publishing 2004.
64. Valdebran M, Mo J, Elston DM, et al. Pattern hair loss: Assessment of inflammation and fibrosis on histologic sections. J Am Acad Dermatol 2020;82(3):757-8.
65. Rakowska A, Slowinska M, Kowalska-Oledzka E, et al. Dermoscopy in female androgenic alopecia: method standardization and diagnostic criteria. Int J Trichology 2009; 1:123-30.
66. Sperling L, Winton GB. The transverse Anatomy of Androgenetic Alopecia. J Dermatol Surg Oncol 1990; 16: 1127-33.
67. Turner NJ, Pezzone MA, Brown BN, et al. Quantitative multispectral imaging of Herovici's polychrome for the assessment of collagen content and tissue remodelling. J Tissue Eng Regen Med 2013;7(2):139–148.
68. Whiting DA. Chronic telogen effluvium: increased scalp hair shedding in middle-aged women. J Am Acad Dermatol 1996;35(6):899-906.
69. Ramos PM, Brianezi G, Martins AC, et al. Apoptosis in follicles of individuals with female pattern hair loss is associated with perifollicular microinflammation. Int J Cosmet Sci 2016;38: 651–654.
70. Lattanand A, Johnson WC. Male pattern alopecia. A histopathological and histochemical study. J Cutan Pathol 1975; 2: 58–70.

71. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Nikkels-Tassoudji N, et al. Improvement in the inflammatory aspect of androgenetic alopecia. A pilot study with an antimicrobial lotion. J Dermatol Treat 1996; 7: 153–157.
72. Lee RT, Briggs WH, Cheng GC, et al. Mechanical deformation promotes secretion of IL-1α and IL-1 receptor antagonist. J Immunol 1997; 159: 5084–88.
73. Gatherwright J, Liu MT, Gliniak C, et al. The contribution of endogenous and exogenous factors to female alopecia: a study of identical twins. Plast Reconst Surg 2012; 130:1219-26.
74. Pereira JM. Alopecia Androgenética (Calvície) na Mulher. 2 ed. São Paulo: Di Livros; 2007.
75. van Zuuren EJ, Fedorowicz Z. Interventions for Female Pattern Hair Loss. JAMA Dermatol 2017;153(3):329–30.
76. Trüeb RM. Female alopecia: guide to successful management. Springer 2013
77. Ramos PM, Brianezi G; Martins ACP; et al. Aryl hydrocarbon receptor is overexpressed in miniaturized follicles in female pattern hair loss. An Bras Dermatol 2017; 92:430-31.
78. Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, et al. Aging and hair cycles. Br J Dermatol 1995; 132:86-93.
79. Schmitt JV, Ribeiro CF, Souza FH, et al. Hair loss perception and symptoms of depression in female outpatients attending a general dermatology clinic. An Bras Dermatol 2012; 87:412-7.
80. Paus R, van der Veen C, Eichmüller S, et al. Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice. J Invest Dermatol 1998;111(1):7-18.
81. Peters E, Tobin D, Botchkareva N, et al. Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-kit expression. J Histochem Cytochem 2002;50(6):751-66.
82. Legué E, Nicolas JF. Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. Development 2005 Sep; 132(18):4143-54.
83. Blume-Peytavi U, Blumeyer A, Tosti A, et al. S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescentes. Br J Dermatol 2011; 164:5-15.
84. Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. Nat Rev Genet 2002;3(3):199-209.
85. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. Dev Dyn 2004;231(2):258-69.
86. Hardy MH. The development of mouse hair in vitro with some observations on pigmentation. J Anat 1949;83(4):364-84 363 p.
87. Valdebran M, Mo J, Doan L, et al. Reply, J Am Acad Dermatol 2020.
88. Lois N, Hiscott PS, Nash J, et al. Immunophenotypic shift in a case of mycosis fungoides with vitreous invasion. Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960). 2000;118(12):1692-94.
89. Richmond J, Tuzova M, Cruikshank W, et al. Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. J Cell Physiol 2014;229(2):139-47.
90. Skundric DS, Cruikshank WW, Drulovic J. Role of IL-16 in CD4+ T cell-mediated regulation of relapsing multiple sclerosis. J Neuroinflammation 2015; 12:78.
91. van Scott EJ, Ekel TM. Geometric Relationships Between the Matrix of the Hair Bulb and its Dermal Papilla in Normal and Alopecic Scalp. J Invest Dermatol 1958; 31:281-7.

92. Whiting DA. Possible mechanisms of miniaturization during androgenetic alopecia or pattern hair loss. J Am Acad Dermatol 2001;45: S81-6.
93. Whiting DA. Advances in the treatment of male androgenetic alopecia: a brief review of finasteride studies. Eur J Dermatol 2001; 11:332-4.
94. Cotsarelis G, Garza LA, Yang CC, et al. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. J Clin Invest 2011;121(2):613–22.
95. Van Scott EJ, Ekel TM. Geometric relationships between the matrix of the hair bulb and its dermal papilla in normal and alopecic scalp. Journal Invest Dermatol 1958; 31:281-287.
96. Couchman, J.R. Rat hair follicle dermal papillae have an extracellular matrix containing basement membrane components. J Invest Dermatol 1986; 87: 762–767.
97. Couchman, JR, McCarthy, KJ, and Woods, A. Proteoglycans and glycoproteins in hair follicle development and cycling. Ann NY Acad Sci 1991; 642: 243–51.
98. Messenger, AG, Elliott, K, Temple, A, and Randall, VA. Expression of basement membrane proteins and interstitial collagens in dermal papillae of human hair follicles. J Invest Dermatol 1991; 96: 93–97.
99. Lowery J, Kuczmarski ER, Herrmann H, et al. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. J Biol Chem 2015;290(28):17145-53.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar achados histopatológicos e imunopatológicos na transição epitélio-mesenquimal dos folículos pilosos (terminais e miniaturizados) em pacientes com alopecia de padrão feminino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a fibrose perifolicular segundo o tipo de colágeno (I *vs*.III), tipo de folículo (terminal *vs*. miniaturizado), as topografias e os graus de gravidade clínica.
2. Quantificar os fibroblastos perifoliculares segundo o tipo de folículo (terminal *vs*. miniaturizado), as topografias e os graus de gravidade clínica.
3. Quantificar o infiltrado inflamatório de linfócitos CD4+ e CD8+ nos folículos pilosos, segundo o tipo de folículo (terminal *vs*. miniaturizado), as topografias e os graus de gravidade clínica.
4. Avaliar a proporção de fios miniaturizados e terminais segundo as topografias e os graus de gravidade da APF.

ARTIGO

Publicação (formato): Artigo de investigação – Anais Brasileiros de Dermatologia

Seção: Artigo original

Título: Estudo da transição epitélio-mesenquimal na alopecia de padrão feminino

Title: Analysis of epithelial-mesenchymal transition in female pattern hair loss.

Autores:
Maira Renata Merlotto
Dermatologista, Mestranda no Programa MEPAREM, FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
Email: merlottomaira@gmail.com
ORCID: 0000-0002-8918-5640
Abreviatura: Merlotto, MR

Paulo Müller Ramos
Dermatologista, PhD, Coordenador Ambulatório Tricoses FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil
Email: dermato.paulo@gmail.com
ORCID: 0000-0002-1561-414X
Abreviatura: Ramos, PM

Hélio Amante Miot
Dermatologista, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil
Email: heliomiot@fmb.unesp.br
ORCID: 0000-0002-2596-9294
Abreviatura: Miot, HA

Local onde o trabalho foi realizado:

Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-000.

Endereço de correspondência:
Prof. Hélio Amante Miot.
Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, SN, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-000.
Fone/FAX: +55 14 38824922
Email: HELIO.A.MIOT@UNESP.BR

Conflito de interesses: Nenhum.

Financiamento: FUNADERM (12/2019).

Participação no trabalho:
Concepção do estudo: Miot, HA; Ramos, PM; Merlotto, MR
Coleta dos dados: Merlotto, MR
Análise dos resultados: Miot HA; Ramos PM; Merlotto, MR
Escrita do texto: Miot HA; Ramos, PM; Merlotto, MR
Revisão e aprovação do texto final: Miot HA; Ramos, PM; Merlotto MR

Resumo

FUNDAMENTOS: Alopecia de padrão feminino (APF) é a principal causa de alopecia em mulheres adultas. Além da predisposição genética e do componente hormonal, a APF apresenta elementos na sua fisiopatologia, ainda não elucidados. O papel de estímulos mesenquimais ao folículo piloso no desenvolvimento da APF não foi investigado sistematicamente.

OBJETIVOS: Avaliação dos elementos envolvidos na transição epitélio-mesenquimal da APF: quantificação e caracterização da fibrose, avaliação quantitativa de fibroblastos dérmicos e quantificação do infiltrado CD4 e CD8 perifoliculares.

MÉTODOS: Estudo transversal, envolvendo biópsias do couro cabeludo (frontal e occipital) de trinta pacientes do gênero feminino portadoras de APF. As amostras foram processadas para HE, Herovici e imuno-histoquímica (CD4, CD8 e vimentina). No grupo horizontal, com 10 pacientes, foram realizados cortes horizontais, e no grupo longitudinal, com 20 pacientes, cortes longitudinais. As variáveis foram comparadas de acordo com o grupo de folículos (terminal versus miniaturizado) e a gravidade da alopecia, segundo classificação clínica de Sinclair.

RESULTADOS: A miniaturização (>10%) dos fios foi identificada tanto na região frontal, quanto occipital dos casos de APF, havendo diferença mais evidente nos casos mais avançados (61% vs 37%; $p < 0.001$). Houve predomínio do infiltrado CD4 perifolicular, mais intenso nos casos clinicamente mais graves (escore médio 2.9 vs 2.6; $p = 0.004$), assim como fibrose (escore médio 2.6 vs. 2.1; $p = 0.006$) e quantidade de fibroblastos (escore médio 2.2 vs. 2.0; $p = 0.035$). Quanto à estrutura folicular envolvida, CD4, CD8 e fibroblastos apresentaram maiores escores na região do istmo ($p<0.048$), nos casos mais graves.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO: Estudo monocêntrico com tamanho amostral modesto.

CONCLUSÕES: Casos mais graves de APF apresentam maior infiltrado CD4, fibrose e quantidade de fibroblastos perifoliculares, especialmente, na região do istmo.

Palavras-chave: Calvície de Padrão Feminino, Alopecia Androgênica, Inflamação, Miniaturização, Fisiopatologia.

Abstract

BACKGROUND: Female pattern hair loss (FPHL) is the most commom type of alopecia in adult women. Aside from the genetic predisposition and the hormonal factors, FPHL has other elements in its pathophysiology, which have not yet been elucidated. The role of mesenchymal stimuli to the hair follicle in the development of FPHL has not been systematically investigated.

OBJECTIVES: Assessment of the elements involved in the FPHL epithelial-mesenchymal transition, in the following aspects: quantification and characterization of perifollicular fibrosis, quantitative assessment of dermal fibroblasts and quantification of CD4 and CD8 infiltrates.

METHODS: Cross-sectional study, involving scalp biopsies (frontal and occipital) of 30 female patients with FPHL. The samples were processed for HE, Herovici and immunohistochemistry (CD4, CD8 and vimentin). In the horizontal group, with 10 patients, horizontal sections were done, and in the longitudinal group, with 20 patients, longitudinal sections. The variables were compared according to the group of follicles (terminal versus miniaturized) and the severity of alopecia, according to Sinclair's clinical classification.

RESULTS: Hair miniaturization (> 10%) was identified both in frontal and occipital area of cases of FPHL, with more evident difference in the advanced cases (61% vs 37%; p <0.001). There was a predominance of peripheral CD4 infiltrate, more intense in clinically more severe cases (mean score 2.9 vs 2.6; p = 0.004), as well as fibrosis (mean score 2.6 vs. 2.1; p = 0.006) and amount of fibroblasts (mean score 2.2 vs 2.0; p = 0.035). As for the follicular structure involved, CD4, CD8 and fibroblasts, higher scores in the region of the isthmus (p <0.048), in the severe cases.

STUDY LIMITATIONS: Monocentric study and modest sample size.

CONCLUSIONS: Severe cases of FPHL presents a greater infiltration of CD4, fibrosis and amount of peripheral fibroblasts, especially in the isthmus region.

Key-words: Pattern hair loss, androgenetic alopecia, inflammation, miniaturization, pathogenesis.

INTRODUÇÃO

A alopecia de padrão feminino (APF) é a principal causa de alopecia em mulheres adultas. Sua frequência aumenta com a idade, acometendo cerca de 25% das mulheres até os 50 anos e chegando a 40% até os 70 anos[1]. Caracteriza-se como alopecia difusa não cicatricial, decorrente de progressiva miniaturização e posterior redução do número de folículos pilosos (FPs), principalmente nas regiões frontal e parietal do couro cabeludo.[2]

A representação do cabelo saudável na vida da mulher implica em sentimentos de autoestima, interação social e qualidade de vida. Em estudo brasileiro, o temor relacionado a perder todos os cabelos era tão grande quanto o de se desenvolver um infarto do miocárdio.[3]

A APF envolve miniaturização progressiva dos FPs. Na avaliação histopatológica de cortes horizontais de amostras de couro cabeludo, observa-se redução na proporção de pelos terminais a semelhantes a velos de mais de 7:1 no couro cabeludo normal para menos de 4:1 na alopecia androgenética (AAG).[4]

Apesar de sua elevada frequência e relevância, a fisiopatologia da APF ainda não é completamente elucidada. Há evidências de elementos genéticos, hormonais e, possivelmente, ambientais envolvidos.[5-7]

A implicação de uma inflamação perifolicular microscópica na AAG emergiu de vários estudos[4,6]. Mahé *et al*[6] propuseram o termo “microinflamação” para descrever tal processo, pois envolve um curso lento e sutil, caracterizado por um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário leve a moderado na região peri-infundibular, com frequência variável, em contraste com o processo inflamatório intenso e destrutivo que ocorre nas alopecias inflamatórias cicatricias clássicas.

A interação epitelio-mesenquimal é indispensável tanto para a morfogênese do FP embrionário, como também para a continuidade do ciclo capilar pós-natal[8-10]. Depois que os FPs atingem a fase anágena madura, a papila dérmica (PD) se comporta como um nicho instrutivo, regulando a proliferação e a diferenciação celular ordenada.[11-12]

Rompolas et al.[9] estudaram a participação do mesênquima na indução da regeneração capilar em camundongos. Descreveram, através de observação ao vivo da replicação celular, que a maioria das divisões ocorre na porção inferior do FP, na interface entre as células progenitoras e o mesênquima no início de uma nova fase de

crescimento, apontando possíveis mecanismos celulares de regulação do crescimento dos fios de cabelo.

Garza et al[13] constataram que a população de células-tronco (CT) é mantida no couro cabeludo acometido por AAG, sugerindo que a perda de células progenitoras, e não de CT, contribui para a condição. Acreditamos que o não desenvolvimento das CT em células progenitoras tenha relação com a supressão de estímulos mesenquimais na região acometida.

A partir de tais dados, inferimos que possíveis alterações na transição epitélio-mesenquimal possam intervir na fisiologia do FP e atuar no desenvolvimento de alopecias não cicatriciais, como a APF. A possível relação entre estímulos mesenquimais e o desenvolvimento da APF ainda não foi investigado sistematicamente.

Visando investigar a participação de constituintes dérmicos no desenvolvimento da APF, foi realizada avaliação dos elementos envolvidos na transição epitélio-mesenquimal da APF, nos seguintes aspectos: quantificação da fibrose perifolicular e análise do tipo de colágeno presente (I vs III), avaliação quantitativa de fibroblastos dérmicos e quantificação do infiltrado CD4 e CD8 perifoliculares.

MÉTODOS

O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa da instituição (nº 2.499.219) e todas as participantes preencheram o termo de consentimento antes da inclusão no estudo. O projeto recebeu financiamento do Fundo de Apoio à Dermatologia (FUNADERM).

Foram incluídas no estudo transversal trinta pacientes do gênero feminino portadores de APF, sem restrição de idade ou fototipo, classificadas de I a III quanto ao grau da alopecia pela escala clínica de Sinclair. Os diagnósticos de APF foram definidos pela presença de mais de 10% de fios miniaturizados à dermatoscopia.[14] As amostras foram coletadas por conveniência, em pacientes acompanhadas no Ambulatório de Dermatologia, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (SP), no período de 2018 a 2019.

A avaliação dos dados coletados incluiu idade, fototipo, classificação do grau da APF pela escala clínica de Sinclair e tratamento prévio.

Foram realizadas biópsias (punch 4 mm) no couro cabeludo acometido na região frontal central e na região occipital. As pacientes foram divididas em dois grupos: no grupo um – grupo horizontal (GH), com 10 pacientes, foram realizados cortes horizontais nas amostras obtidas pela biópsia, e, no grupo dois – grupo longitudinal (GL), com 20 pacientes, cortes longitudinais.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Todos as amostras de couro cabeludo foram fixadas em formol 10% e incluídas em blocos de parafina, seguido do preparo das lâminas histológicas. Cortes de 3 µm foram processados para histoquímica (H&E e Herovici) e imuno-histoquímica (CD4, CD8 e vimentina).

Fios terminais foram classificados por seu diâmetro maior ou igual a 0,06 mm. Fios miniaturizados foram classificados pelo diâmetro menor que 0,06 mm. A revisão das lâminas histológicas foi feita pela autora e pelo orientador da pesquisa (H.A.M).

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os anticorpos primários utilizados foram CD4, CD8 e vimentina. Lotes utilizados: FLEX Monoclonal Mo a Hu CD4, Clone 4B12, RTU; FLEX Monoclonal Mo a Hu CD8, Clone C8/144B, RTU e FLEX Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone 9, Ready-to-Use, Referência IR630 (Dako).

Para a demonstração da expressão de CD4, CD8 e vimentina, as amostras incluídas em parafina foram seccionadas com navalhas de aço inox na espessura de 3 µm em micrótomo rotativo. Em seguida, os cortes das amostras foram estendidos em lâminas histológicas de vidro foscas de bordas esmerilhadas, previamente tratadas com organo-silano. Após 18 horas em estufa a 58ºC, os cortes passaram pelo processo de desparafinização em xilol e, em seguida, pelo etanol absoluto seguindo para hidratação. A recuperação antigênica foi feita pelo calor em equipamento PT-LINK (Dako), com solução de pH alto, por 20 minutos a 95°C.

Reação de imuno-histoquímica automatizada foi realizada em equipamento Dako Link 48. Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena através da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, por 5 minutos, em temperatura ambiente. Seguido de lavagem em solução salina tamponada e

incubação dos anticorpos CD4 (Dako), CD8 (Dako) e Vimentina (Dako), todos pré-diluídos, prontos para uso, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Seguido de lavagem em solução salina tamponada. A seguir, procedeu-se à incubação do anticorpo conjugado (secundário e terciário) Labelled Polymer Flex/HRP (Dako), por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem em solução salina tamponada. Realizada revelação pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidine (DAB-DAKO) por 5 minutos, seguido de lavagem em solução salina tamponada. Contra-coloração feita em Hematoxilina (Dako) por 10 minutos, seguida da lavagem em água destilada. A seguir, realizada desidratação em etanol absoluto e xilol e montagem com lamínulas em resina sintética.

A padronização das diluições dos anticorpos foi realizada baseado na menor concentração capaz de evidenciar marcação nos controles positivos de cada marcador. Todas as reações foram confirmadas com controles positivos e negativos. A avaliação microscópica e os registros fotográficos foram realizados com Pannoramic Viewer.

O infiltrado inflamatório foi avaliado nas lâminas a partir de escore semiquantitativo (0 a 4+), de acordo com a identificação de até dez células marcadas em torno do folículo (1+), 10 a 20 células (2+) e assim sucessivamente, tanto nos cortes horizontais, como nos verticais (Figuras 1 e 2). A avaliação do escore de intensidade de infiltrado inflamatório CD4 e CD8 (GH) foi definido por: (G4*4 + G3*3 + G2*2 + G1) / número de folículos avaliados.

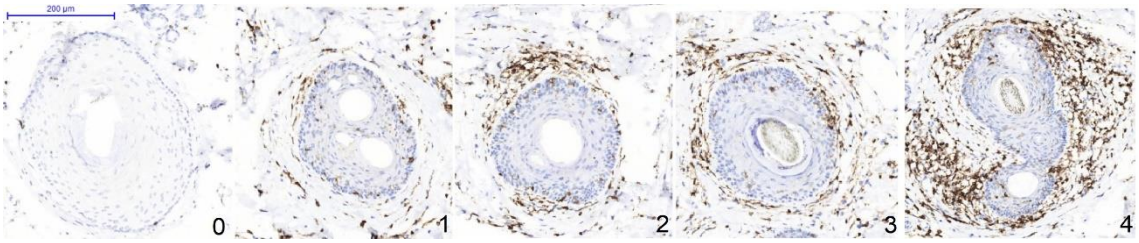


Figura 1. GH. Graus de infiltrado inflamatório CD4/CD8 de 0 a 4.

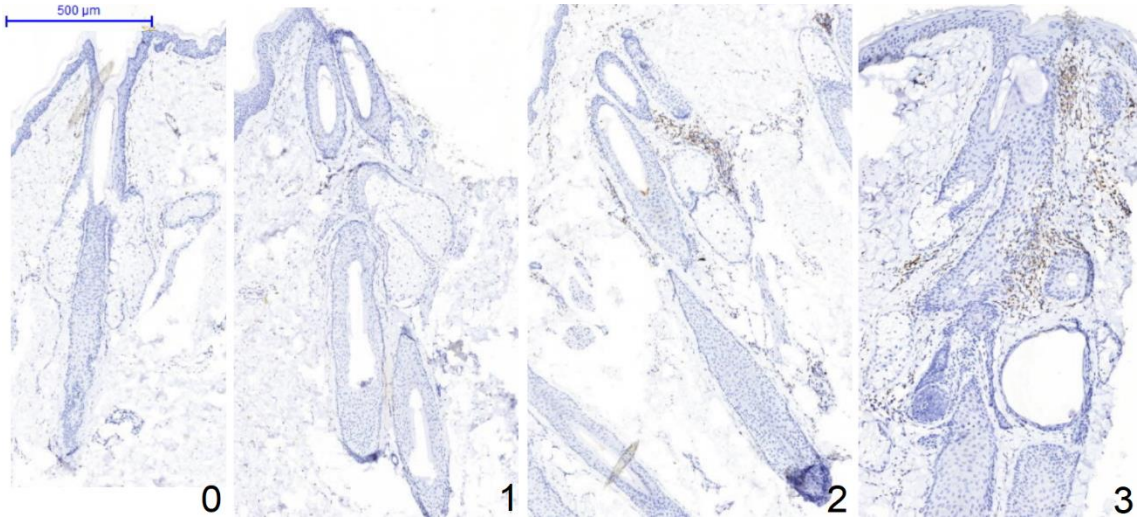


Figura 2. GL. Graus de infiltrado inflamatório 0 a 4, nas porções do FP (infundíbulo, istmo e bulbo).

Vimentina é marcador de células de origem mesenquimal, tipicamente expressa em fibroblastos, mas também em células endoteliais e células dendríticas foliculares em menor proporção[15]. Neste estudo, foi utilizada para quantificação dos fibroblastos na região perifolicular. Para análise dos marcadores anti-vimentina, os cortes foram analisados semiquantitativamente (1 a 3+), quanto à porcentagem do diâmetro do FP acometido de 0% a 50% (1+); 50% a 75% (2+) e >75% (3+) (Figura 3). O escore de vimentina (GH) foi definido por: (G3*3 + G2*2 + G1) / número de folículos avaliados. A avaliação do Grupo longitudinal (GL) demonstrou as áreas imunomarcadas nas diferentes porções do FP (infundíbulo, istmo e segmento inferior) (Figura 4).

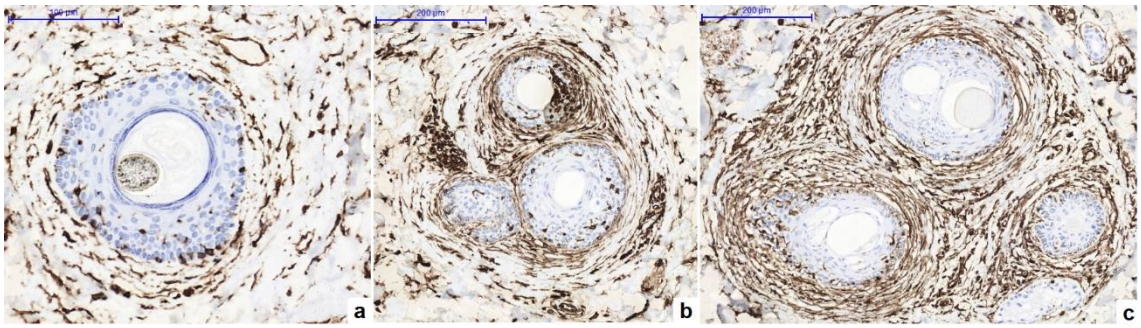


Figura 3. GH. Escore de vimentina. Densidade e distribuição da positividade para antivimentina ao redor dos folículos pilosos. a. Vimentina positiva baixo grau. b. Vimentina positiva grau moderado. c. Vimentina fortemente positiva.

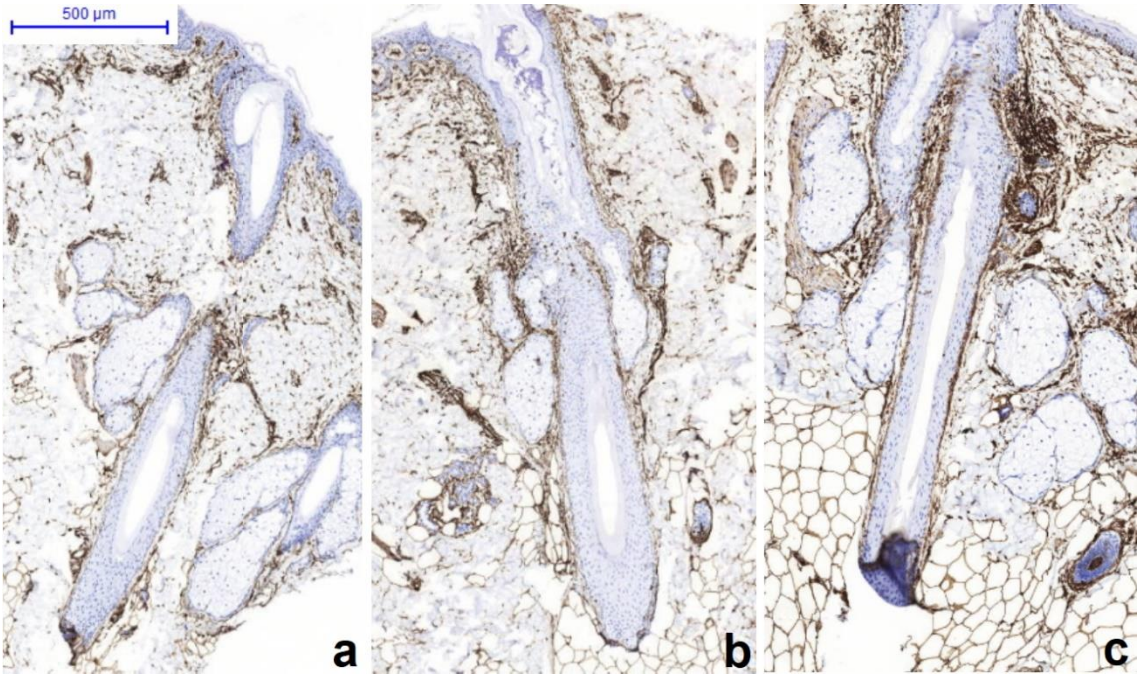


Figura 4. GL. Escore de vimentina. Densidade e distribuição da positividade para vimentina nas porções dos folículos pilosos. a. Vimentina positiva grau I, envolvendo infundíbulo e istmo. b. Vimentina positiva grau II, envolvendo infundíbulo e istmo. c. Vimentina fortemente positiva, grau III, envolvendo infundíbulo e istmo.

O método de Herovici foi utilizado para caracterização do colágeno tecidual, em que cora colágeno tipo I de coloração vermelha e colágeno tipo III (neoformado) de azul, para avaliação da fibrose perifolicular (Figura 5). Optou-se pela avaliação semiquantitativa (1 a 3+), quanto à porcentagem do diâmetro do FP acometido de 0% a 50%(1+); 50% a 75% (2+) e >75% (3+) e por meio da classificação do colágeno - frouxo, moderado ou denso - ao redor dos folículos ilustrados. O Escore de intensidade de fibrose foi definido por (G3*3 + G2*2 + G1) / número de folículos avaliados. A avaliação do grupo longitudinal (GL) caracterizou o colágeno perifolicular, distribuído nas diferentes porções do FP (infundíbulo, istmo e segmento inferior) (Figura 6).

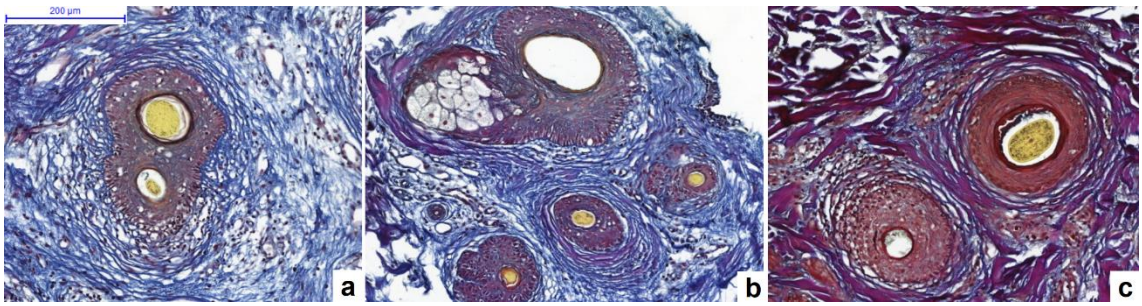


Figura 5. GH. Escore de intensidade de fibrose. Densidade e distribuição de colágeno ao redor dos folículos pilosos. a. Colágeno frouxo. b. Fibras colágeno moderadas, predomínio azul. c. Colágeno denso, predomínio vermelho.

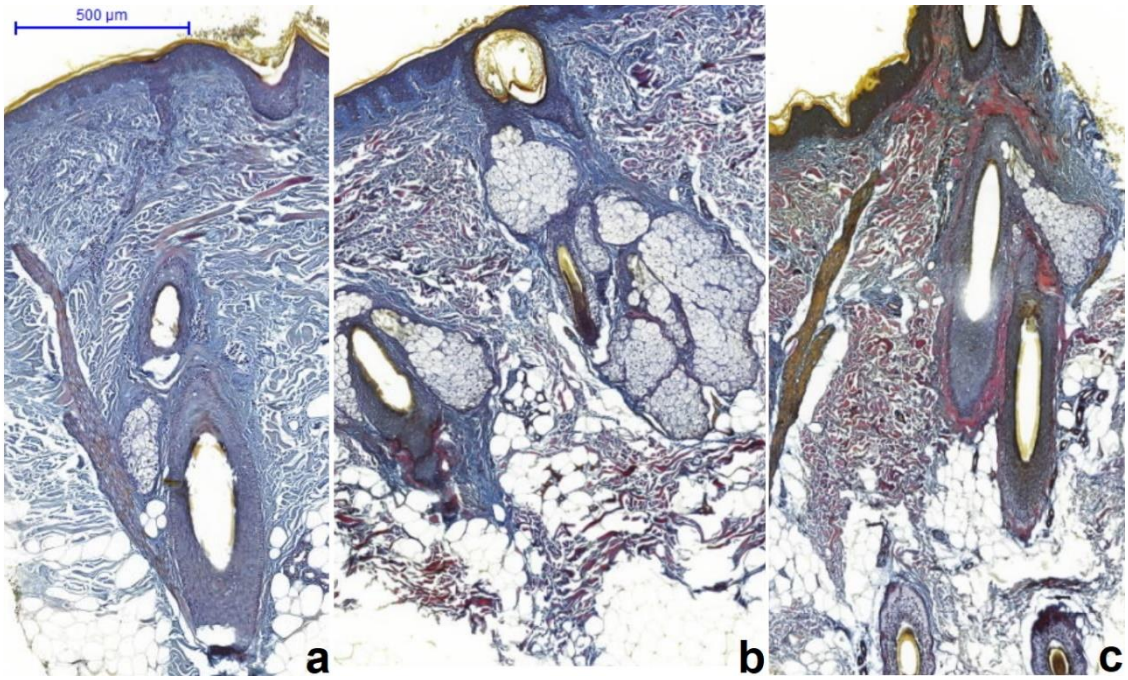


Figura 6. GL. Escore de intensidade de fibrose. Densidade e distribuição do colágeno nas porções dos folículos pilosos. a. Colágeno perifolicular denso, predomínio tipo III. b. Colágeno moderado, tipos I e III. c. Predomínio colágeno tipo I.

ANÁLISE ESTATÍSTICA E AMOSTRAGEM

As unidades de análise foram os *clusters* de folículos de cada paciente, segundo as categorias morfológicas (terminal *versus* miniaturizado), topografia (frontal *vs*. occipital) e gravidade dos casos (escala de Sinclair).

Os escores histológicos foram comparados quanto à topografia, gravidade clínica e quanto às categorias morfológicas por modelo linear generalizado de efeitos mistos, com estrutura de covariância robusta e distribuição de probabilidade adequada para cada amostra. A comparação *post hoc* dos subgrupos da análise foi corrigida pelo algoritmo de Šidák. Foram considerados significativos valores de $p<0.05$.

O comportamento das variáveis estudadas foi explorado de forma multivariada pela técnica de análise de correspondência múltipla, onde a proximidade espacial dos centroides no mapa perceptual sugere correlação multivariada.

Dados foram tabulados em MsExcel 2013 e analisados no software IBM SPSS 25.

A amostragem foi dimensionada a fim de detectar uma diferença de mais de 30% na expressão imuno-histoquímica ou contagem celular em uma categoria folicular, com poder de 80%.

RESULTADOS

A idade das participantes variou de 22 a 68 anos, sendo a maior parte com fototipos intermediários: II a IV. Quanto à gravidade da alopecia, o grupo de cortes horizontais apresentou distribuição bastante homogênea quanto aos grupos Sinclair, enquanto nos cortes longitudinais, prevaleceram Sinclair II e III. Os tratamentos mais referidos foram minoxidil tópico e espironolactona oral (Tabela 1). Não foram incluídas pacientes com fenótipos de hiperandrogenismo.

Tabela 1. Principais dados clínicos e demográficos das pacientes do estudo.

	Grupo H (horizontal)	**Grupo L (longitudinal)**	**Total**
N	10	20	30
Idade (anos)*	46 (14)	50 (12)	49 (13)
Fototipo			
I	1 (10%)	4 (20%)	5 (17%)
II	3 (30%)	3 (15%)	6 (20%)
III	3 (30%	7 (35%)	10 (33%)
IV	2 (20%)	4 (20%)	6 (20%
V	1 (10%)	2 (10%)	3 (10%)
Grau de Sinclair			
I	3 (30%)	1 (5%)	4 (13%)
II	3 (30%)	9 (45%)	12 (40%)
III	4 (40%)	10 (50%)	14 (47%)
Tratamento atual			
Minoxidil	10 (100%)	17 (85%)	27 (90%)
Espironolactona	3 (30%)	4 (20%)	7 (23%)
Finasterida	1 (10%)	3 (15%)	4 (13%)

*média (desvio-padrão)

Os achados histológicos de 481 folículos (GH) demonstraram que, dentre as pacientes classificadas como Sinclair I e II, não houve diferença geral na proporção de fios miniaturizados entre a região frontal e occipital (p=0.361), indicando que o fenômeno de miniaturização dos fios, no início da doença, ocorre em todo couro cabeludo e não apenas na região frontal. Já nos quadros clínicos mais avançados

(Sinclair III), verificou-se maior proporção global de fios miniaturizados, além de ser mais intenso e evidente na região frontal do que na região occipital (p=0.004). Por fim, nos casos mais avançados (Sinclair III) também houve aumento global do percentual de miniaturização dos fios (p<0.001). (Tabela 2)

Tabela 2. Percentual médio (desvio-padrão) de fios miniaturizados segundo a topografia e o grau de Sinclair (Grupo 1).

	Sinclair I-II		**Sinclair III**		**p-valor (II)**
		p-valor (I)		**p-valor (I)**	
Frontal	35 (11)	0.361	72 (10)	**0.004**	
Occipital	39 (14)		50 (24)		
Total	37 (13)		61 (21)		**<0.001**

(I) Frontal *vs*. Occipital; (II) Sinclair I-II *vs.* Sinclair III;
Modelo linear generalizado de efeitos mistos: p(modelo)<0.01; Correção *post hoc*: Sidak sequencial.

Os achados imuno-histoquímicos (CD4, CD8 e vimentina) e fibrose referentes ao GH, em relação à classificação clínica da alopecia, estão condensados na Tabela 3. Houve predomínio de infiltrado CD4 em relação a CD8. Verificou-se associação do maior infiltrado inflamatório de CD4 conforme maior grau de Sinclair, tanto entre os fios miniaturizados, quanto nos terminais (p=0.004). De forma geral, a relação CD4/CD8 foi 4,0 (IC 95% 3,3 a 4,6), sendo mais intensa nos casos leves (Sinclair I-II) 4,3 (IC 95% 3,4 a 5,3), que nos casos mais avançados (Sinclair III), em que a relação é 3,5 (IC 95% 2,9 a 4,0). A intensidade do infiltrado de CD4 foi maior nos folículos miniaturizados na região frontal (p=0.022).

Tabela 3. GH. Escore médio (desvio-padrão) integrado de CD4, CD8, fibrose, colágeno e vimentina, de acordo com a classificação de Sinclair.

	Sinclair I-II	p(valor) (I)	Sinclair III	p(valor) (I)	p(valor) (II)
Escore CD4+		0.118		0.870	
Miniaturizado	2.6 (0.5)		2.9 (0.5)		
Terminal	2.5 (0.5)		2.7 (0.4)		
Total	2.6 (0.5)		2.8 (0.4)		**0.004**
Escore CD8+		0.722		0.296	
Miniaturizado	0.7 (0.4)		0.8 (0.2)		
Terminal	0.8 (0.4)		0.9 (0.4)		
Total	0.7 (0.4)		0.9 (0.3)		0.357
Escore de Fibrose					
Miniaturizado	2.1 (0.6)	0.518	2.5 (0.4)	0.332	
Terminal	2.2 (0.5)		2.7 (0.3)		
Total	2.1 (0.5)		2.6 (0.3)		**0.006**
Escore de Vimentina					
Miniaturizado	1.8 (0.4)	**0.001**	2.2 (0.3)	0.983	
Terminal	2.2 (0.4)		2.2 (0.6)		
Total	2.0 (0.5)		2.2 (0.5)		**0.035**

(I) Terminal *vs*. Miniaturizado; (II) Sinclair I-II *vs*. Sinclair III.
Modelo linear generalizado de efeitos mistos; Correção *post hoc*: Sidak sequencial

Constatou-se que os escores de vimentina não apresentaram diferença entre fios miniaturizados *versus* terminais (p=0.369). Com relação à classificação clínica, os escores de vimentina foram maiores nos fios terminais de formas leves de Sinclair (p=0.001), e, sem diferença entre as topografias, nos casos Sinclair III (p=0.035).

Não houve diferença no grau de fibrose perifolicular entre fios miniaturizados (p=0.184) e terminais (p=0.686). Os escores de fibrose foram maiores nas pacientes com alopecia mais avançada - grau Sinclair III (p=0.006).

A avaliação multidimensional (Figura 7) evidencia os agrupamentos de CD4, vimentina e CD8 se correlacionando com as diferentes classificações de Sinclair.

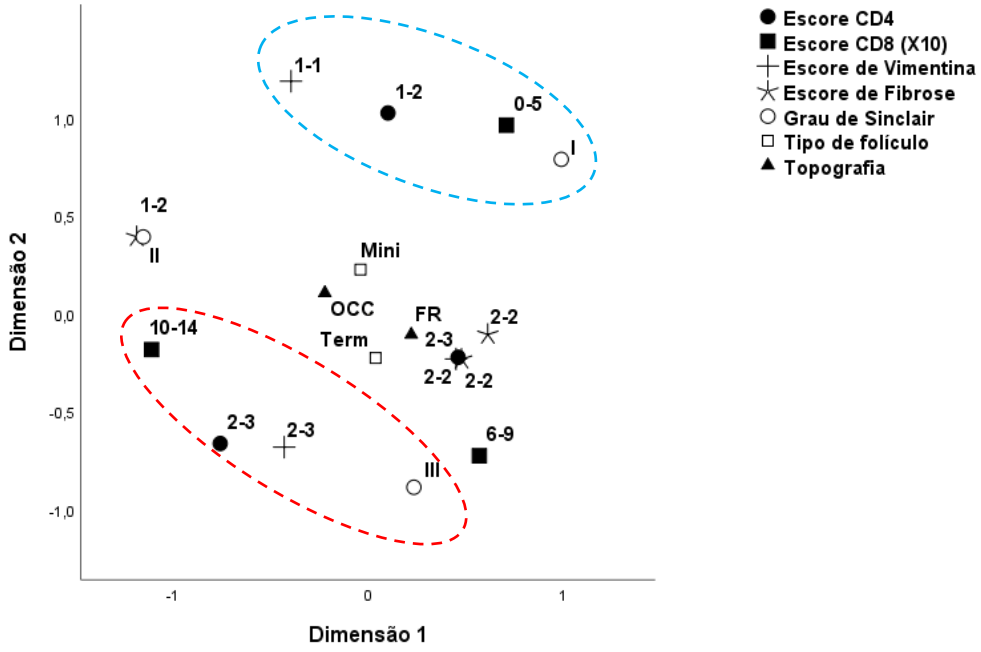


Figura 7. Mapa perceptual da análise de correspondência multidimensional dos parâmetros avaliados no Grupo H (GH).

Os achados imuno-histoquímicos (CD4, CD8 e vimentina) e fibrose referentes ao GL, em relação à classificação clínica da alopecia, estão condensados na Tabela 4. Descrevemos infiltrado CD4 mais intenso no infundíbulo, que istmo e bulbo e, em relação à topografia, mais intenso no infundíbulo da região frontal (p=0.005). O infiltrado CD8 foi mais intenso no infundíbulo, que istmo e bulbo. Em relação à topografia, é mais intenso no istmo (p=0.010) e bulbo (p=0.041), também da região frontal. Houve associação do infiltrado CD4 com o grau de gravidade clínica, sendo mais intenso no infundíbulo e istmo dos casos mais graves, Sinclair III (p=0.007). O infiltrado CD8 também foi mais intenso no istmo dos casos mais graves, Sinclair III (p=0.039).

Na avaliação de fibrose perifolicular, foi encontrada maior quantidade de colágeno do tipo III localizado no istmo na região frontal (p=0.011).

A expressão de vimentina demonstrou maior quantidade de fibroblastos em todas as porções do FP na região frontal (infundíbulo p=0.014; istmo p=0.008 e porção inferior p<0.001), em relação à região occipital.

Ressaltamos o maior infiltrado de CD4 (p=0.007) e CD8 (p=0.0039) e maior quantidade de fibroblastos (p=0.047) no istmo de casos mais graves.

Tabela 4. GL. Escore médio (desvio-padrão) integrado, de acordo com a Classificação de Sinclair.

	CD4+		p-valor	CD8+		p-valor	Colágeno I		p-valor	Colágeno III		p-valor	Vimentina		p-valor
	Sinclair I-II	Sinclair III		Sinclair I-II	Sinclair III		Sinclair I-II	Sinclair III		Sinclair I-II	Sinclair III		Sinclair I-II	Sinclair III	
Infundíbulo			0.368			0.115			0.448			0.345			0.395
0	- (-)	- (-)		6 (30%)	1 (5%)		- (-)	- (-)		- (-)	- (-)		- (-)	- (-)	
I	8 (40%)	7 (35%)		11 (55%)	12 (60%)		6 (30%)	7 (35%)		3 (15%)	6 (30%)		3 (15%)	- (-)	
II	10 (50%)	8 (40%)		3 (15%)	6 (30%		9 (45%)	10 (50%)		8 (40%)	5 (25%)		7 (35%)	7 (35%)	
III	2 (10%)	5 (25%)		- (-)	1 (5%)		5 (25%)	3 (15%)		9 (45%)	9 (45%)		10 (50%)	13 (65%)	
Istmo			**0.007**			**0.039**			0.091			0.274			**0.047**
0	4 (20%)	2 (10%)		7 (35%)	3 (15%)		- (-)	- (-)		- (-)	- (-)		5 (25%)	5 (25%)	
I	10 (50%)	4 (20%)		10 (50%	11 (55%)		5 (25%)	7 (35%)		10 (50%)	8 (40%)		11 (55%)	3 (15%)	
II	5 (25%)	11 (55%)		3 (15%)	5 (25%)		9 (45%)	12 (60%)		8 (40%)	7 (35%)		4 (20%)	12 (60%)	
III	1 (5%)	3 (15%)		- (-)	1 (5%)		6 (30%)	1 (5%)		2 (10%)	5 (25%)		- (-)	- (-)	
Bulbo			0.652			0.240			0.189			0.839			0.790
0	15 (75%)	14 (70%)		17 (85%)	16 (80%)		- (-)	- (-)		- (-)	- (-)		8 (40%)	6 (30%)	
I	5 (25%)	5 (25%)		3 (15%)	4 (20%)		11 (55%)	15 (75%)		17 (85%)	18 (90%)		11 (55%)	4 (20%)	
II	- (-)	1 (5%)		- (-)	- (-)		7 (35%)	4 (20%)		3 (15%)	2 (10%)		1 (5%)	- (-)	
III	- (-)	- (-)		- (-)	- (-)		2 (10%)	1 (5%)		- (-)	- (-)		- (-)	- (-)	

Na avaliação multidimensional (Figura 8), destacou-se maior comprometimento do infundíbulo e istmo. A região frontal do couro cabeludo se associa a quadros clínicos mais graves (Sinclair grau III), assim como a maior expressão de CD4, CD8 e maior quantidade de fibroblastos (vimentina) e colágeno do tipo III perifoliculares.

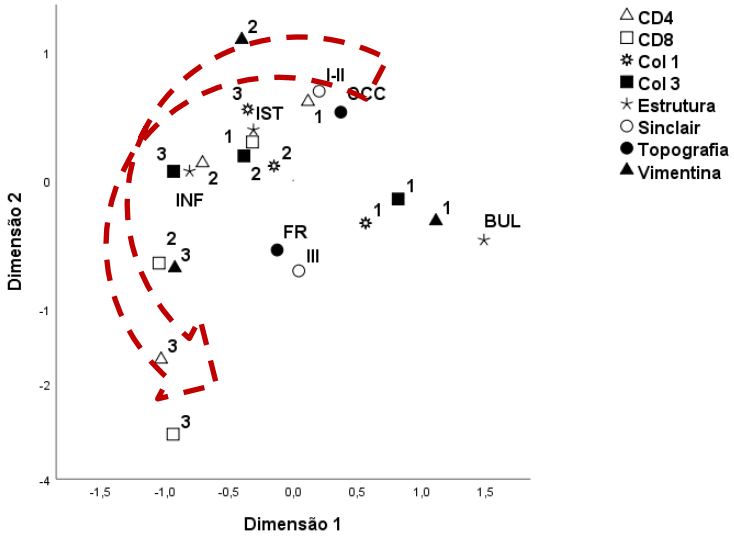


Figura 8. Mapa perceptual da análise de correspondência multidimensional dos parâmetros avaliados no Grupo 2 (GL).

DISCUSSÃO

O presente estudo contribuiu para o entendimento do modelo fisiopatológico que envolve a participação da interação epitélio-mesenquimal no desenvolvimento da APF.

A presença de um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário leve a moderado na região peri-infundibular tem sido descrita como possível elemento na patogênese da APF.[4,6] Whiting, em sua avaliação de cortes horizontais de 106 homens com APM e 22 controles (13 homens e 9 mulheres), descreveu como o principal achado na APM o aumento da proporção de fios miniaturizados em relação a fios terminais. Além de redução da razão anágeno/telógeno e, em casos avançados, redução da densidade folicular. Relatou ainda infiltrado inflamatório perifolicular e fibrose, que podem estar associados a pior prognóstico.[4] Mais tarde, em uma nova série de 412 pacientes com APF, descreveu a presença de inflamação e fibrose em 71.4% das pacientes.[16]

Recentemente, Valdebran[17] avaliou 37 pacientes com diagnóstico de AAG (6 homens e 31 mulheres) e, como controles, 45 biópsias antigas do acervo do serviço

de dermatopatologia da Universidade Irvine da Califórnia, EUA. Foi encontrado infiltrado inflamatório linfocítico perifolicular em 73% dos casos, sendo escasso em 5.4%, leve em 57% e moderado em 11%. Em 27% dos casos não foi vista inflamação. O infiltrado foi predominante no infundíbulo em 70% dos casos, e na região próxima ao istmo em 3%. Os controles apresentaram inflamação perifolicular em 84%, sendo 9% escasso, 67% leve, 9% moderado e ausente em 16%. Maioria encontrada no infundíbulo (84%). Não foram encontradas diferenças significativas quanto à inflamação entre os dois grupos.[17]

Nosso estudo demonstrou não haver diferença no percentual de fios miniaturizados, em relação ao número total de FPs avaliados e em relação à topografia no couro cabeludo (frontal *versus* occipital), exceto nas pacientes com rarefação capilar mais intensa, grau Sinclair III. Nesses casos clínicos mais avançados, houve maior percentual de miniaturização dos fios de forma global, além de também ser mais intenso na região frontal. A partir de tais achados, imputamos que há acometimento de todo o couro cabeludo (miniaturização>10%) na APF, desde as formas mais iniciais da doença, sendo que, quanto mais grave o quadro clínico, há maior comprometimento frontal que occipital.

Na avaliação imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório, com relação à topografia, houve maior infiltrado CD4 nos folículos miniaturizados apenas na região frontal, em relação à região occipital. De forma independente, houve aumento do escore CD4, conforme aumento da gravidade clínica, sem diferença entre fios miniaturizados e terminais. Já o infiltrado CD8 não apresentou o mesmo padrão. Dessa forma, destacamos o predomínio de CD4, como possível agente atuando desde o início do processo fisiopatológico do desenvolvimento da APF.

O GL foi essencial para permitir a avaliação da profundidade de acometimento do FP e distinção das porções do FP acometidas no desenvolvimento da APF. A avaliação da profundidade pode ser avaliada através de cortes histopatológicos horizontais, mas como no estudo foram utilizados diferentes colorações e protocolos, com múltiplos cortes no mesmo espécime de biópsia, os cortes longitudinais foram fundamentais. Os cortes horizontais propiciaram avaliação adequada da região do *bulge* e os cortes longitudinais também do infundíbulo e segmento inferior. Tanto o infiltrado CD4, quanto CD8 foram mais intensos no infundíbulo. Sendo que, na região frontal, CD4 foi mais intenso no infundíbulo e CD8 foi mais intenso no istmo e bulbo. Houve correlação do grau de infiltrado CD4 com o grau de gravidade clínica, sendo

mais intenso no infundíbulo e istmo dos casos mais graves, Sinclair III. O infiltrado CD8 também foi mais intenso no istmo dos casos mais graves.

Os achados de CD4 no GL ratificam o padrão de infiltrado CD4 no GH, sendo mais intenso, quanto mais grave o quadro clínico. Os dados da altura do infiltrado, principalmente no infundíbulo e istmo, são concordantes com descrições prévias de Whiting e Valdebran.[4,17]

A observação de que o infiltrado CD4 é mais intenso nos casos mais graves é coerente com os achados de Ramos et al,[18] que avaliaram inflamação e apoptose de amostras histológicas de 17 mulheres com APF e cinco controles femininos por cortes horizontais. A inflamação não diferiu entre APF e controles (p = 0,3), porém foi mais intensa nos folículos miniaturizados quando comparados aos terminais (p = 0,02). Além disso, a inflamação correlacionou-se com o índice de apoptose folicular (rho = 0,68).[18]

A relação CD4/CD8 foi 4,0 (IC 95% 3,3 a 4,6), mais intensa nos casos leves (Sinclair I-II), que nos casos mais avançados (Sinclair III). Acreditamos que tais achados reflitam a frequência superior de linfócitos T CD4+ desde as fases iniciais do desenvolvimento da APF, atuando no processo patogênico da doença e, conforme ocorre sua progressão, resulta no aumento do número de linfócitos T CD8+, secundariamente ao aumento de CD4+.

Valdebran[19] destacou, que na maioria dos infiltrados inflamatórios há predomínio de linfócitos T CD4+ sobre CD8+ na proporção 2-3:1, e que isso permite refletir sobre o papel que citocinas, como a interleucina-16 (IL-16), podem desempenhar na patogênese da APF. A IL-16 madura é secretada pelas células como um ligante para CD4+. Originalmente, isso era chamado de fator de quimiotaxia de linfócitos; porém sabe-se atualmente que eosinófilos, mastócitos, monócitos e linfócitos B também são responsivos à IL-16[20], orquestrando, assim uma resposta imune complexa. Além disso, foi sugerido que a IL-16 poderia regular a caspase-3, levando à apoptose celular[21.] Tais séries de eventos moleculares descritos podem se correlacionar com os achados do presente estudo.[19,22]

Nos cortes horizontais, não houve diferença na fibrose perifolicular entre fios miniaturizados e terminais, nem entre as topografias da região frontal e occipital. No entanto, a fibrose perifolicular foi mais intensa nas pacientes com quadro clínico mais avançado (Sinclair III), comprometendo tanto fios terminais quanto miniaturizados. Whiting, ao analisar amostras de couro cabeludo horizontais, indicou que a fibrose

perifolicular geralmente é leve, consistindo em camadas concêntricas, frouxas de colágeno fibrótico, que devem ser diferenciadas das alopecias cicatriciais.[4]

Os fibroblastos dérmicos são células mesenquimais responsáveis pela síntese de colágeno e glicosaminoglicanos, componentes da matriz extracelular (MEC), que têm função de suporte e estrutura da pele.[23] As suas funções vão além de produzir material para MEC e, além disso, apresentam importante papel nas diferenças regionais das características da pele em nosso organismo, como nas áreas de predominância de fios terminais (couro cabeludo e barba) e de fios miniaturizados (pele glabra).[15]

Diversos estudos experimentais apontam a PD mesenquimal como importante centro de sinalização. As PDs podem induzir o crescimento capilar quando implantadas na epiderme de outras áreas[24,25] ou promover a regeneração e crescimento de fios seccionados. Esses dados evidenciam que fatores mesenquimais externos ao FP podem ser determinantes na sua atividade e capacidade de regeneração.[25]

Os escores de vimentina, representanto a quantidade de fibroblastos, também foram maiores, de forma geral, nos casos Sinclair III. Assim sendo, identificamos um padrão em que há maior quantidade de fibroblastos e mais fibrose perifolicular, quanto mais grave for o quadro clínico.

Na análise longitudinal, também houve correlação dos escores de fibrose e vimentina com os casos mais avançados, Sinclair III. O escore de vimentina demonstrou aumento de fibroblastos em todas as porções do FP na região frontal: infundíbulo, istmo e bulbo, sendo que houve destaque para o acometimento do istmo nos casos Sinclair III.

A avaliação da fibrose tecidual foi classificada, com base no tipo de colágeno predominante: I *versus* III. Foi evidente o predomínio de colágeno tipo III no istmo da região frontal. Acreditamos que o predomínio do colágeno tipo III, neoformado, ilustre provável processo de remodelação do colágeno e desenvolvimento de fibrose perifolicular, que ocorre nos casos de alopecia mais avançados.

Valdebran[17] também descreveu fibrose em 68% dos casos de AAG, sendo leve em 65% e moderado em 3%. Em todos estes casos, a fibrose era localizada na região infundibular – concordante com nossos achados. Dentro do grupo controle, fibrose presente em 82.2%, também no infundíbulo. A partir da análise tais dados, não encontraram diferenças estatisticamente significantes e sugeriram que inflamação e

fibrose não teriam papel no desenvolvimento da APF, sendo necessários estudos maiores.[17] Porém, seu estudo foi limitado pela falta de cortes histológicos horizontais e por uma diferença importante em relação ao gênero estudado: 16% *versus* 71% de homens no grupo alopecia e nos controles.

Na nossa avaliação de perspectiva multivariada, parecem se correlacionar juntos os escores de CD4, CD8, vimentina e classificação de Sinclair. Os escores de vimentina e de fibrose se correlacionaram com o infiltrado CD4 e CD8 nos fios miniaturizados. Foi vista correlação entre o grau infiltrado CD4 e CD8 e fibroblastos no istmo de casos mais graves.

Há diversos estudos que versam sobre a participação de fatores ativadores da inflamação na fisiopatologia da AAG, sob perspectivas diferentes[4,6,16,17,26-28]. O processo de fibrose envolvendo a bainha de tecido conjuntivo do FP é descrito como etapa final do processo que resulta na miniaturização e involução do aparelho pilossebáceo na AAG. Também foi observado infiltrado perifolicular predominante na porção superior do FP, próximo ao infundíbulo. [4,17,26-28]

Mahé et al.[6] descreveram a associação da miniaturização do FP a um depósito de colágeno ou tecido fibroso em feixes, perifolicular, na bainha de tecido conjuntivo, associado a degranulação de mastócitos. Isso sugere que o evento causal primário, que desencadeia o processo inflamatório possa ocorrer próximo ao infundíbulo.[26,28,29] Pode-se especular que vários microorganismos presentes no couro cabeludo, como a 'tríade' (Propionibacterium sp.; Staphylococcus sp.; Malassezia ovalis) ou outros membros do microbioma da pele poderiam estar envolvidos nesse complexo processo inflamatório[28]. A presença de porfirinas (produzidas por Propionibacterium sp.) no ducto pilossebáceo foi capaz de induzir a produção de complemento (C5), fator quimiotático, sendo considerado um possível cofator desse estresse pró-inflamatório inicial[28,29]. Os queratinócitos são conhecidos por responder em questão de minutos ao estresse químico, poluentes, irradiação UV ou mesmo estresse mecânico.[29]

Os achados histopatológicos de microinflamação e fibrose perifolicular também são encontrados no processo de envelhecimento do FP.[30] A alopecia senil (AS) que ocorre em ambos os sexos com idade avançada, mesmo sem histórico familiar, é caracterizada pela miniaturização difusa dos FPs. Entretanto, a caracterização clínica de formas iniciais de AS não é completamente distinguível da APF[31]. Nesse ínterim, as alterações da transição epitélio-mesenquimal podem revelar semelhanças fenotípicas da miniaturização folicular, o que pode sugerir que a miniaturização da

APF seja uma forma precoce de envelhecimento folicular. A exploração comparativa de casos de APF e AS deve favorecer o entendimento fisiopatológico de ambas as entidades.

A partir dos estudos prévios correlacionando o processo inflamatório como desencadeante da remodelação do colágeno e consequente fibrose perifolicular, como atuantes na fisiopatologia da APF, propomos um possível mecanismo fisiopatológico que envolve a participação da interação epitélio-mesenquimal no desenvolvimento da APF, que pode desempenhar papel tanto no seu desenvolvimento, quanto na sua progressão. Correlacionamos o grau do infiltrado inflamatório e da fibrose perifolicular com a gravidade clínica da APF.

Nosso estudo apresenta potenciais limitações como estudo monocêntrico, modesto tamanho amostral (especialmente GH). Apesar disso, foi possível evidenciar resultados ligados à microinflamação e à fibrose nos FPs nessas pacientes.

CONCLUSÃO

Os achados histopatológicos e imunopatológicos deste estudo permitiram caracterizar alterações da transição epitélio-mensenquimal no desenvolvimento da APF. Identificamos um padrão de predomínio de colágeno tipo III, neoformado no istmo da região frontal, sem diferença entre fios miniaturizados e terminais.

Reconhecemos um padrão de maior quantidade de fibroblastos perifoliculares nos quadros clínicos mais avançados, sem diferença entre fios miniaturizados e terminais, independentemente da topografia.

Descrevemos infiltrado inflamatório perifolicular caracterizado por aumento de CD4, conforme aumento da gravidade clínica; mais intenso no infundíbulo e istmo dos casos mais graves, sem diferença entre fios miniaturizados e terminais. O infiltrado CD8 foi mais intenso no istmo dos casos mais graves, sem diferença entre fio miniaturizado e terminal, ou entre as topografias. Destacamos o predomínio de CD4, como possível agente na fisiopatologia da APF.

Detectamos maior percentual de miniaturização dos fios de forma global nas pacientes com APF, além de também ser mais intenso na região frontal nos casos mais avançados.

Concluímos que casos mais graves de APF apresentam maior infiltrado CD4, fibrose e quantidade de fibroblastos perifoliculares, especialmente, na região do istmo.

REFERÊNCIAS

1. Fabbrocini G, Cantelli M, Masara A, et al. Female pattern hair loss: a clinical, pathophysiologic, and therapeutic review. Int J Women Dermatol 2018; 4(4):203-211.
2. Ramos PM and Miot HA. Female Pattern Hair Loss: a clinical and pathophysiological review. An Bras Dermatol 2015; 90(4): 529–543.
3. Penha MA, Santos PM, Miot HA. Dimensioning the fear of dermatologic diseases. An Bras Dermatol 2012; 87:796-9.
4. 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.
5. Trüeb RM. Systematic approach to hair loss in women. J Dtsch Dermatol Ges 2010;8(4):284-98.
6. Mahe YF, Michelet JF, Billoni NB, et al. Androgenetic alopecia and microinflammation. Int J Dermatol 2000; 39: 576-84.
7. Messenger AG. Hair through the female life cycle. Br J Dermatol 2011;165 Suppl 3:2-6.
8. Mesa KR, et al. Niche-induced cell death and epithelial phagocytosis regulate hair follicle stem cell pool. Nature 2015;522(7554):94–7.
9. Rompolas P, et al. Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration. Nature 2012;487(7408):496–9.
10. Yu Z, et al. Hoxc-dependent mesenchymal niche heterogeneity drives regional hair follicle regeneration. Cell Stem Cell 2018;23(4):487–500 e6.
11. Sennett R, Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. Semin Cell Dev Biol 2012;23(8):917–27.
12. Myung PS, et al. Epithelial Wnt ligand secretion is required for adult hair follicle growth and regeneration. J Invest Dermatol 2013;133(1):31–41.
13. Garza LA, Yang C, Zhao T, Blatt HB, et al. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. J Clin Investig 2011; 121:613–622.
14. Rakowska A, Slowinska M, Kowalska-Oledzka E, et al. Dermoscopy in female androgenic alopecia: method standardization and diagnostic criteria. Int J Trichology 2009; 1:123-30.
15. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. J Clin Invest 2018; 2;128(1):26-35.
16. Whiting DA. Chronic telogen effluvium: increased scalp hair shedding in middle-aged women. J Am Acad Dermatol 1996;35(6):899-906.
17. Valdebran M, Mo J, Elston DM, et al. Pattern hair loss: Assessment of inflammation and fibrosis on histologic sections. J Am Acad Dermatol 2020;82(3):757-8.
18. Ramos PM, Brianezi G, Martins AC, et al. Apoptosis in follicles of individuals with female pattern hair loss is associated with perifollicular microinflammation. Int J Cosmet Sci 2016; 38:651–654.
19. Valdebran M, Mo J, Doan L, et al. Reply, J Am Acad Dermatol 2020.

20. Richmond J, Tuzova M, Cruikshank W, et al. Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. J Cell Physiol 2014;229(2):139-147.

21. Skundric DS, Cruikshank WW, Drulovic J. Role of IL-16 in CD4+ T cell-mediated regulation of relapsing multiple sclerosis. J Neuroinflammation 2015; 12:78.

22. Merlotto MR, Ramos, PM, Miot HA. Pattern hair loss: assessment of microinflammation in miniaturized and terminal hair follicles through horizontal histologic sections. J Am Acad Dermatol 2020.

23. Thangapazham R et al. Alteration of Skin Properties with Autologous Dermal Fibroblasts. Int J Mol Sci 2014; 15,8407-27.

24. Jahoda, CAB, et al. Trans-gender induction of hair follicles Nature 1999; 402, 33.

25. Jahoda CA; Horne KA; Oliver, RF. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. Nature 1984, 311, 560–562.

26. Jaworsky C, Kligman AM, Murphy GF. Characterization of inflammatory infiltrates in male pattern alopecia: implication for pathogenesis. Br J Dermatol 1992; 127:239–46.

27. Lattanand A, Johnson WC. Male pattern alopecia. A histopathological and histochemical study. J Cutan Pathol 1975; 2: 58–70.

28. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Nikkels-Tassoudji N, et al. Improvement in the inflammatory aspect of androgenetic alopecia. A pilot study with an antimicrobial lotion. J Dermatol Treat 1996; 7: 153–157.

29. Gatherwright J, Liu MT, Gliniak C, et al. The contribution of endogenous and exogenous factors to female alopecia: a study of identical twins. Plast Reconst Surg 2012; 130:1219-26.

30. Williams R, Pawlus AD, Thornton MJ. Getting under the skin of hair aging: the impact of the hair follicle environment [published online ahead of print, 2020 May 2]. Exp Dermatol. 2020

31. Karnik P, Shah S, Dvorkin-Wininger Y, et al. Microarray analysis of androgenetic and senescent alopecia: comparison of gene expression shows two distinct profiles. J Dermatol Sci 2013;72(2):183-86.

32. Schmidt-Ulrich R, Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. Bioessays 2005;27(3):247-61.

33. Stenn KS, Paus R. Controls of hair cycling. Physiol Rev 2001;81(1):449-94.

34. Millar, SE. Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development. J Invest Dermatol 2002;118(2):216-25.

35. Randall VA. Androgens and hair growth. Dermatol Ther 2008; 21:314-28.

36. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. N Engl J Med 1999;341(7):491-97.

37. Jahoda CA. Induction of follicle formation and hair growth by vibrissa dermal papillae implanted into rat ear wounds: vibrissa-type fibres are specified. Development 1992;115(4):1103–09.

38. Oliver RF. The experimental induction of whisker growth in the hooded rat by implantation of dermal papillae. J Embryol Exp Morphol 1967;18(1):43–51.

39. Alonso, L, Fuchs, E. The hair cycle. J Cell Science 2006; 119: 391-93.

40. Huang WY, et al. Mobilizing transit-amplifying cell-derived ectopic progenitors prevents hair loss from chemotherapy or radiation therapy. Cancer Res 2017; 77(22):6083–96.

41. Huang WY, et al. Anagen hair follicle repair: timely regenerative attempts from plastic extra-bulge epithelial cells. Exp Dermatol 2019;28(4):406–12.

42. Jahoda CAB. Cellular and developmental aspects of androgenetic alopecia. Exp Dermatol 1998; 7: 235-48.

43. Couchman JR, McCarthy KJ, Woods A. Proteoglycans and glycoproteins in hair follicle development and cycling. Ann NY Acad Sci 1991; 642: 243–251.

44. Messenger AG, Elliott K, Temple A, et al. Expression of basement membrane proteins and interstitial collagens in dermal papillae of human hair follicles. J Invest Dermatol 1991; 96: 93–97.

45. Bernard, BA. The human hair follicle, a bistable organ? Exp Dermatol 2012; 21, 401-3.

46. Malgouries S, Thibaut S, Bernard BA. “Proteoglycan expression patterns in human hair follicle,” Br J Dermatol 2008; 158(2),234–242.

47. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occuring in the female sex. Br J Dermatol 1977; 97:247-54.

48. Sinclair R, Wewerinke M, Jolley D. Treatment of female pattern hair loss with oral antiandrogens. Br J Dermatol 2005; 152:466-73.

49. Redler S, Messenger AG, Betz RC. Genetics and other factors in the aetiology of female pattern hair loss. Exp Dermatol 2017; 26:510–517.

50. Yang H, et al. Epithelial-Mesenchymal micro-niches govern stem cell lineage choices. Cell 2017;169(3):483–96 e13.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Continuação do Parecer: 2.499.219

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1016986.pdf	14/01/2018 20:13:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.pdf	14/01/2018 20:12:43	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio2018.pdf	14/01/2018 20:12:23	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	14/01/2018 20:12:12	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
Outros	AnaliseDgaa_Hcfmb.pdf	11/12/2017 18:03:04	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tcle.pdf	11/12/2017 17:57:43	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
Folha de Rosto	Plat_Brasil155MairaRenataMerlotto.Pdf	11/12/2017 17:53:59	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaHcfmb.pdf	11/12/2017 17:50:36	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	11/12/2017 17:50:11	MAIRA RENATA MERLOTTO	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

BOTUCATU, 19 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

O orçamento financeiro foi estimado em R$17.500,00. Os pesquisadores informam ainda que somente será iniciada a coleta dos dados após a aprovação no comitê de ética e liberação da verba pelas agências de fomento. A duração prevista do estudo será de 24 meses.

O TCLE apresentado esta em forma de convite e explicativo dos objetivos e procedimentos do estudo, bem como direitos do pacientes se não quiser participar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentara, todos os documentos exigidos para a execução do Projeto de Pesquisa:

- Folha de Rosto (Cumprimento da Resolução 466);
- Anuência Institucional;
- Análise do Projeto - DGAA;
- Anuência do responsável pelo Ambulatório de Dermatologia;
- Regulamento Funcional do Biorepositório;
- Projeto de Pesquisa
- Projeto de Pesquisa (Plataforma Brasil);
- Cronograma de Execução;
- TCLE.

Recomendações:

- Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos apresentados para o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo da transição epitélio-mesenquimal na alopecia de padrão feminino", recomendo a aprovação, sem necessidade de envio à CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 05 de fevereiro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa, no entanto, informa que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o “Relatório Final de Atividades”, na forma de "Notificação", via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, a Senhora para participar do Projeto de Pesquisa intitulado **"ESTUDO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NA ALOPECIA DE PADRÃO FEMININO"**, que será desenvolvido por mim, Maira Renata Merlotto, médica residente da Dermatologia, com orientação do profissional Hélio Amante Miot, Professor Adjunto de Dermatologia, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia, da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP.

Estou estudando a doença Alopecia de Padrão Feminino. Preciso coletar duas biópsias com punch nº4 (4mm) do seu couro cabeludo, que serão submetidas ao estudo anatomopatológico. Após realização das biópsias, será realizado sutura das lesões. Receberá carta para retirada dos pontos da sutura após 10 dias. O risco com a biópsia será a lesão de 4mm, com sutura logo após.

Informo que o material biológico colhido da Senhora ,não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que a Senhora assine nova autorização para utilização desse material.

Solicito também seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas, referentes a consultas feitas anteriormente pela Senhora.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retira-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento. Seu benefício em participar será possibilitar maior conhecimento da fisiopatologia da doença que a acomete. Caso não houver benefício neste momento, os benefícios serão para futuros pacientes, após os pesquisadores terem o conhecimento dos resultados da pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contrato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu,_____/___/_____

_____ _____
Pesquisador Participante da Pesquisa

Nome: Maira Renata Merlotto
Endereço: Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp / Câmpus de Botucatu. Rubião Junior – Botucatu/ SP – CEP 18618-970
Telefone: (14) 99861-2808
Email: merlottomaira@gmail.com

Nome: Hélio Amante Miot
Endereço: Rua Magnólia, 400, Botucatu
Telefone: (14) 3882-4922
Email: heliomiot@fmb.unesp.br

ANEXO 3– CRONOGRAMA

CRONOGRAMA PROJETO ”ESTUDO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL NA ALOPECIA DE PADRÃO FEMININO”

Atividade	**01/02/2018 a 06/02/2018**	**09/03/2018 a 12/03/2018**	**01/04/2018 a 31/11/2018**	**01/04/2018 a 31/11/2018**	**01/02/2019 a 30/06/2019**	**01/06/2019 a 31/08/2020**
1)Submissão ao Comitê de Ética e Pesquisa	**X**					
2) Submissão às instituições de fomento		**X**				
3) Reunião das amostras e dados dos pacientes			**X**			
4) Preparo das lâminas HE e Imuno-histoqumica			**X**	**X**		
5) Análise das lâminas			**X**	**X**		
6) Análise estatística dos dados coletados					**X**	
7) Confrontação com a literatura				**X**	**X**	**X**
8) Confecção de artigo científico e dissertação para divulgação – Congressos, publicação					**X**	
9) Revisão da Literatura	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**

ANEXO 4 – APROVAÇÃO INSTITUIÇÃO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - UNESP

DECLARAÇÃO DO HCFMB

DECLARO que tenho **CIÊNCIA e AUTORIZO** a realização do projeto de pesquisa intitulado: " Estudo da transição epitélio-mesenquimal na alopecia de padrão feminino. " a ser desenvolvido pelo: Mestrando - Maira Renata Merlotto orientado por Helio Amante Miot, tendo como cenário da pesquisa o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB), conforme descrito no projeto posteriormente à sua análise de custos e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

GARANTO o cumprimento da resolução 466/12 e suas complementares, além do total apoio institucional na execução deste projeto por meio da utilização de toda infraestrutura e serviços disponíveis do **HCFMB**.

Por ser verdade, firmo o presente.

Botucatu, 25 de Outubro de 2017.

Prof. Dr. André Luis Balbi
Superintendente do HCFMB

Superintendência do Hospital das Clínicas
Distrito de Rubião Junior, s/n | CEP 18618-970
Botucatu | São Paulo | Brasil
Tel.: (14) 3811-6215 | 3811-6218 | 3811-6100 | Fax. 3882-5387
www.hcfmb.unesp.br | superintendencia@fmb.unesp.br

SIPE ISS - 2017

ID: 1119087

TERMO DE CIÊNCIA E ANUÊNCIA
(a ser preenchida pela chefia Imediata do Serviço)

Eu, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, responsável pelo Departamento de Patologia, declaro que estou ciente e de acordo com o projeto de pesquisa: "Estudo da transição epitélio-mesenquimal na alopecia de parão feminino", a ser desenvolvido pela pesquisadora Maira Renata Merlotto, orientado por Helio Amante Miot e coorientado por Mariangela Esther Alencar Marques, nesta unidade no período de 02/01/2018 a 31/12/2019.

Após a aprovação do projeto supracitado pelo Comitê de Ética (CEP) o mesmo poderá ser conduzido neste Serviço de forma não interferir na operacionalização e/ou atividades cotidianas.

Botucatu, 31 de outubro de 2017.

Assinatura e Carimbo do Responsável pelo Serviço

Dra Maria Ap M Rodrigues
CRM 31722
Médica-Patologista

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP

TERMO DE CIÊNCIA E ANUÊNCIA
(a ser preenchida pela chefia Imediata do Serviço)

Eu, Helio Amante Miot, responsável pelo Serviço: Ambulatório de Tricoses – Dermatologia, declaro que estou ciente e de acordo com o projeto de pesquisa: "Estudo da transição epitélio-mesenquimal na alopecia de parão feminino", a ser desenvolvido pelo pesquisador Maira Renata Merlotto orientado por Helio Amante Miot nesta unidade no período de 02/01/2018 a 31/12/2019.

Após a aprovação do projeto supracitado pelo Comitê de Ética (CEP) o mesmo poderá ser conduzido neste Serviço de forma não interferir na operacionalização e/ou atividades cotidianas.

Botucatu, 26 de outubro de 2017.

Dr. Helio Amante Miot
Dermatologista
CRM 94949 CBO 2231-17
CNS 980016004909527

Assinatura e Carimbo do Responsável pelo Serviço

Superintendência do Hospital das Clínicas
Distrito de Rubião Júnior, s/n | CEP 18618-970
Botucatu | São Paulo | Brasil
Tel. (14) 3811-6215 | 3811-6218 | 3811-6100 | Fax 3882-5387
www.hcfmb.unesp.br | hcbotu@fmb.unesp.br

Depto. de Gestão de Atividades Acadêmicas
Distrito de Rubião Júnior, s/n | CEP 18618-970
Botucatu | São Paulo | Brasil
Tel. (14) 3811-6426