

FLAVIO RICHETI

Determinação da expressão do gene do receptor androgênico em mulheres com alopecia androgenética

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências da Saúde

São Paulo
2011

FLAVIO RICHETI

Determinação da expressão do gene do receptor androgênico em mulheres com alopecia androgenética

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Kochi

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Longui

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Richeti, Flavio

Determinação da expressão do gene do receptor androgênico em mulheres com alopecia androgenética./ Flavio Richeti. São Paulo, 2011.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Cristiane Kochi

Co-Orientador: Carlos Alberto Longui

1. Alopecia 2. Receptores androgênicos 3. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 4. Repetições de trinucleotídeos

BC-FCMSCSP/65-11

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A minha esposa Danielle pelo incentivo, companheirismo e auxílio em todos os momentos.

A minha filha Marissa, pela responsabilidade de eu me tornar exemplo e me dedicar sempre mais, além de mostrar a simplicidade de saber como encarar a vida.

Aos meus pais Fernando "in memoriam" e Olímpia, pela formação do meu caráter, amor, auxílio e confiança, "Saudades PAI".

Aos meus irmãos: Fernando Jr., Fabio e Francine e meus cunhados: Paula, Luciana e Célio, pela amizade e admiração mútuas.

Ao meu sogro e sogra, Benedicto e Lourdes e cunhada Lucylle pelo apoio e retaguarda!

Aos pequenos Fernando Neto e Maria Fernanda pela vitalidade e eterna lembrança de que um dia já fomos crianças!

Aos meus primos e primas, tios e tias.

E a todos aqueles que auxiliaram direta ou indiretamente na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hudson de Souza Buck, Diretor do Departamento de Ciências Fisiológicas da FCMSCSP.

Ao Prof. Murilo Rezende de Melo pelo suporte nos momentos de dúvida e necessidade.

À Profa. Mylene Neves Rocha pelo apoio, suporte e conselhos sempre oportunos e pela amizade plena.

Aos Professores da Banca de Exame de Qualificação e Defesa pelas sugestões e críticas de tamanha importância para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Mirtes Dias Souza e toda equipe da Pós Graduação.

À Sadia Mustafá, Aparecida Suely Orlandeli pelo apoio e orientações e ao amigo Laércio Lima pelo suporte.

À Carla Sant'Anna Correa pela ajuda nos momentos de necessidade.

À Dra. Rosana Lazzarini pelo suporte e ajuda direta

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) nº do projeto 471278/2009-2 pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e a Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho, pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os pacientes que, voluntariamente, cederam suas esperanças em busca de algo melhor para todos.

E meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a idealização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço de forma especial aos Professores Dr. Carlos Alberto Longui e Dra. Cristiane Kochi pela confiança, orientação, paciência, dedicação, entrega e, principalmente, pela alegria que este momento tão nobre proporciona na vida de qualquer pessoa.

Muito Obrigado.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ΔR_n =	Diferença entre densidade luminosa do receptor e emissor
ABL =	Exemplo de gene normalizador (<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog</i>)
AGA =	Alopecia Androgenética
AR =	Receptor Androgênico (<i>Androgen Receptor</i>)
BCR =	Gene normalizador (<i>Breakpoint Cluster Region</i>) localizado no braço curto do cromossomo 22 região 11.21
CAG=	Repetições de trinucleotídeos presente no exon 1 do gene AR
CCD =	<i>Charge coupled device</i>
Ct =	Ciclo limite (<i>Cycle threshold</i>)
DHEA-S=	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
DHT =	Dihidrotestosterona
dNTPs =	Desorribonucleotídeo trifosfato
6-FAM =	6- carboxi fluorersceína (<i>6-carboxyfluorescein</i>)
GAPDH=	Exemplo de gene normalizador (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
G6PD =	Exemplo de gene normalizador (<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>)
OMIM =	Herança mendeliana humana disponível online (<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)
PCR =	Reação de cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain reaction</i>)
qRT-PCR =	PCR quantitativa em Tempo Real
R2 =	Correlação entre a regressão linear e os dados dos pontos da curva
TAMRA =	6-carboxi-tetrametilrodamina (<i>6-carboxytetramethylrhodamine</i>)

Xq11-12 = Braço longo do cromossomo X, região 11-12

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	03
1.1.1 A Alopecia	04
1.1.2 Características	04
1.1.2.1 Fase Anágena	04
1.1.2.2 Fase Catágena	05
1.1.2.3 Fases Telógena e exógena	05
1.2 Classificação	06
1.2.1 A Alopecia Androgenética	06
1.2.2 Ação Hormonal	07
1.3 O gene do Receptor Androgênico (OMIM: 313700)	08
1.4 Justificativa do trabalho	10
2. OBJETIVOS	12
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1 Comissão de Ética	15
3.2 Casuística	15
3.2.1 Critérios de inclusão	15
3.2.2 Critérios de exclusão	15
3.3 Coleta de amostras de bulbo capilar	16
3.4 Análise bioquímica	16
3.5 Análise Molecular	17
3.6 Extração do RNA	17
3.6.1 Bulbo capilar (amostras)	17
3.6.2 Próstata (curva padrão)	17
3.7 Reação enzimática de transcrição reversa	18
3.8 PCR em tempo real (RT-PCR)	19
3.9 Iniciadores e sondas direcionados ao gene AR	22
3.9.1 Iniciadores e sondas direcionados ao gene normalizador	23
3.9.2 A Reação dePCR em tempo real (qRT-PCR)	23
3.10 Construção da Curva Padrão	24
3.11 Cálculo da expressão da amostra	26
3.12 Genotipagem e sequenciamento	28

3.12.1 Genotipagem	29
3.13 Sequenciamento automático	31
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Análise da expressão do gene AR	38
5.2 Análise do número de repetições CAG do exon 1 do gene do AR	42
5.3. Correlação entre a expressão do gene do AR e repetições CAG	44
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	52
8. ANEXOS	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICES	69
RESUMO	73
ABSTRACT	75

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento, diferenciação e secreção da glândula sebácea e do folículo piloso dependem da ação da testosterona e da dihidrotestosterona (DHT) ao nível do receptor androgênico. Síndromes hiperandrogênicas apresentam manifestações características como a alopecia, a qual pode ser causada pela secreção excessiva de andrógenos ou por aumento da sensibilidade do tecido-alvo. A expressão excessiva de receptores androgênicos é um potencial mecanismo causador de hipersensibilidade e seu reconhecimento pode ter implicações na seleção de pacientes a serem tratados com medicamentos específicos que antagonizem a ação periférica da testosterona. O objetivo deste estudo é avaliar a expressão tecido-específica do gene do receptor de andrógenos em mulheres com alopecia androgenética bem como correlacionar a expressão ao número de repetições CAG no exon 1 do gene do receptor androgênico (AR).

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Alopecia

A alopecia é o termo empregado para expressar a diminuição generalizada ou localizada de cabelos, barba e outros pêlos do ser humano. Podem ser dos tipos: Alopecia androgenética (AGA) relacionada a causas hormonais, alopecia areata que não apresenta causa hormonal e está relacionada ao estresse emocional e a fenômenos auto imunes, além daquelas decorrentes de uso de inibidores da recaptção da serotonina.⁽¹⁾

1.1.2 Características

Em média, a quantidade de cabelos em um indivíduo normal varia de 100.000 a 150.000 fios, sendo que a média de perda diária varia entre 50 e 100 fios. Nos adultos, o crescimento está ao redor de 0,37mm a 0,44mm por dia ou 1 cm por mês.⁽²⁾

O folículo piloso diferencia-se de outras estruturas epiteliais por não apresentar um crescimento contínuo durante sua vida, passando por ciclos que compreendem as seguintes fases descritas abaixo:

1.1.2.1 Fase Anágena

Fase de crescimento dos fios. Caracteriza-se por apresentar uma alta taxa mitótica sendo que, no ser humano, pode apresentar longos períodos de crescimento como na cabeça, 2 a 6 anos, e períodos mais curtos de crescimento como o bigode, que dura entre 4 a 14 semanas⁽³⁾.

No início desta fase as células totipotentes, responsáveis pelo desencadeamento do ciclo capilar presentes numa região chamada bulge, são ativadas por sinalizadores específicos, originando então um novo cabelo que permanece em crescimento e alongando-se continuamente em direção a derme mais profunda.

1.1.2.2 Fase Catágena

Nesta fase ocorre parada da divisão celular, interrupção da atividade e apoptose dos melanócitos e o folículo se contrai em direção a superfície. ⁽⁴⁾

1.1.2.3 Fases Telógena e Exógena

Estas fases são caracterizadas pela ausência de crescimento dos pelos sendo que, no couro cabeludo, dura de três a quatro meses culminando com a queda do mesmo. Neste momento os folículos entram em repouso estando ligado à estrutura folicular periférica da pele. No momento que esta estrutura é perdida se caracteriza a fase exógena, em que o bulbo apresenta somente a estrutura remanescente da bainha interna. ⁽⁴⁾ A força de tração necessária para remoção de um fio de cabelo é similar à fase catágena, enquanto para remoção de um fio de cabelo na fase exógena a força necessária é muito menor. ⁽⁴⁾

1.2 Classificação

As alopecias classificam-se em cicatriciais e não cicatriciais.⁽⁵⁾ As alopecias cicatriciais são oriundas de mal-formações, danos ou destruição dos folículos pilosos, que deixam de produzir o cabelo, seja por falha do próprio folículo ou por algum processo externo como, por exemplo, queimaduras.⁽⁵⁻⁶⁾ Já as alopecias não-cicatriciais envolvem a entrada precoce dos folículos na fase telógena, do ciclo e o encurtamento da fase anágena, tornando os cabelos mais curtos, finos e despigmentados.⁽⁵⁾

1.2.1 Alopecia Androgénica (AGA)

A AGA caracteriza-se pela diminuição progressiva dos fios, sendo clinicamente classificada de acordo com a distribuição da ausência dos cabelos.⁽⁷⁾ É a forma mais comum de alopecia onde 50% dos homens com 50 anos de idade e 40% das mulheres na menopausa apresentam algum grau da doença.⁽⁵⁾

No homem ocorre nas áreas fronto parietais e/ou no vértice da cabeça. Na mulher é mais comumente observado um tipo de alopecia fronto temporal, sem haver calva propriamente dita.⁽⁶⁾ Na AGA ocorre a substituição progressiva dos fios terminais de cabelo por outros mais finos, curtos e sem pigmento. Durante o crescimento do cabelo, em cada passagem pelo ciclo, a duração da fase anágena diminui e a fase telógena aumenta. Como a duração da fase anágena é o principal determinante do comprimento do cabelo, o tamanho máximo do novo pelo em fase anágena se torna menor a cada ciclo. Eventualmente, a fase anágena se torna tão curta que o pelo emergente não alcança a superfície cutânea.⁽⁸⁾

Os folículos pilosos contêm receptores para andrógenos e, na presença destes hormônios, são ativados genes que reduzem a fase anágena do ciclo folicular. No homem o

quadro clínico mais característico tem evolução progressiva, iniciando-se nas regiões frontoparietais e vertex. Na mulher, o comprometimento do couro cabeludo é difuso, mais acentuado nas regiões centro-parietais e com a relativa preservação de uma faixa de cabelos no contorno frontal. ⁽⁵⁾

A ação androgênica nas células alvo como as do folículo piloso, a ação da enzima 5 alfa redutase e os receptores androgênicos estão diretamente relacionados a etiopatogenia da alopecia. ⁽⁹⁾

1.2.2 Ação Hormonal

O complexo pilo-sebáceo é uma estrutura com capacidade de síntese e metabolização de andrógenos bem como constitui um tecido-alvo para a ação dos mesmos. ⁽¹⁰⁾

Tanto a testosterona quanto a DHT agem ligando-se ao mesmo receptor androgênico presente no núcleo das células-alvo destes tecidos. ⁽¹¹⁾

No citoplasma, a testosterona é convertida a DHT pela 5- alfa- redutase. Também no citoplasma encontramos o AR ligado a proteínas de choque térmico, as quais o impedem de exercer sua função trans-ativacional. A DHT se liga ao AR e, posteriormente, este dímero migra para o interior do núcleo da célula. ⁽¹²⁾

O complexo ativado receptor-hormônio age na regulação da transcrição de genes, por meio de sua ligação aos elementos responsivos presentes na região reguladora dos genes-alvo.

Em mulheres com produção excessiva de andrógenos, o complexo pilo-sebáceo é hiper-estimulado, com peculiaridades loco-regionais como o crescimento de pelos em regiões ventrais e de cabelos na região fronto-parietal. ⁽¹³⁾ Estas ações regionais são devidas ao tipo e fase de desenvolvimento do folículo piloso e intensidade da ação androgênica. ⁽¹⁴⁾

Quadros de AGA também são observados em mulheres com concentrações circulantes normais de testosterona e DHT, associados à metabolização local ou a maior sensibilidade aos andrógenos⁽⁷⁾. A hipersensibilidade em tais situações pode ser devida a polimorfismos gênicos ou à expressão excessiva dos receptores androgênicos.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

1.3 O gene do Receptor Androgênico (OMIM: 313700)

O gene do AR está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq11-12). Tem uma extensão de 75-90 Kb, que consiste de oito exons e uma região codificadora de 2757 pares de bases.⁽¹⁸⁾

Apresenta três domínios funcionais, além de uma região de dobradiça conhecida como “*hinge*”:

Domínio N-terminal que serve uma função moduladora e é codificado pelo exon 1, constituído por 1613 pares de bases, sendo responsável pela regulação da transcrição do gene;

Domínio de ligação ao DNA codificado pelos exons 2 e 3, constituído por 65 aminoácidos e que apresenta dois dedos de zinco capazes de ligar os elementos responsivos ao receptor, presentes no gene-alvo da ação androgênica;

Domínio de ligação ao andrógeno, codificado pelos exons 4 a 8.⁽¹⁹⁾

A região de dobradiça “*hinge*” é codificada pela porção 5 do exon 4. Esta região contém um sinal de localização nuclear necessário para a translocação do complexo andrógeno receptor do citoplasma para seu sítio de ação nuclear e também exerce a ligação dos domínios de ligação ao DNA e domínio de ligação ao andrógeno. O AR, assim como outros receptores esteróides, tem seu sinal de localização nuclear bipartido, que depende da ligação do

andrógeno, situado entre a ligação carboxi-terminal do domínio de ligação e a região de dobradiça estando localizado entre os aminoácidos 617 e 633. ⁽²⁰⁾ (Fig 1)

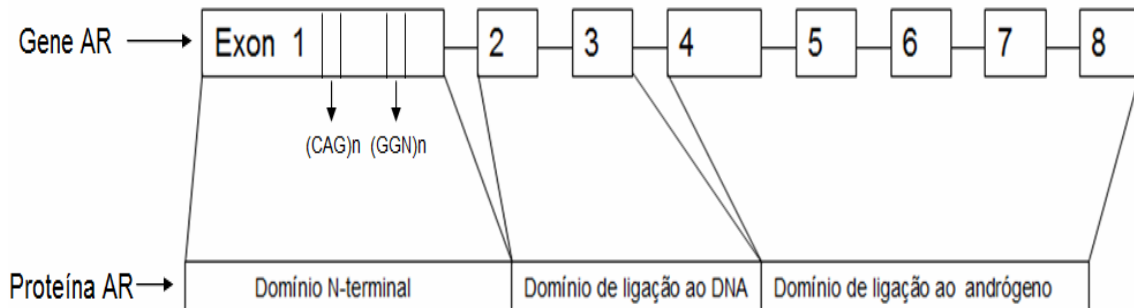


FIGURA 1 - Domínio do receptor androgênico com os três principais domínios: Domínio N-terminal codificado pelo exon 1 incluindo as regiões de repetições CAG e GGN, domínio de ligação ao DNA codificado pelos exons 2 e 3 e domínio de ligação ao andrógeno, codificado pelos exons 4 a 8.

O primeiro exon codifica um extenso domínio ativador da transcrição, constituído por 555 aminoácidos com extensão correspondente a mais da metade da proteína. O exon 1 é composto por duas regiões de repetição polimórficas, codificando extensões variáveis de trechos de glutamina e poliglicina no domínio n terminal da proteína do AR. As duas regiões de repetições são separadas por 248 resíduos de aminoácidos de sequências não polimórficas. A região correspondente as poliglutaminas encontra-se especificamente a partir do códon 58 e é codificada pelo trinucleotídeo CAG que se apresenta em número variável de repetições.

A presença dessas repetições está relacionada à regulação da expressão gênica, de forma que quanto menor o número de repetições, maior a expressão do gene do receptor androgênico. ^(13, 16)

Já a área correspondente a poliglicina é uma região complexa, representada pelo pelas repetições (GGN) sendo elas $(GGT)^3GGG (GGT)^2 (GGC)^n$ cujo comprimento varia de 10 a 30 repetições.

Apesar da região de síntese das poliglicinas estar relativamente próxima a região das glutaminas não há indicação da correlação dessa área ao desenvolvimento da alopecia androgenética.⁽²¹⁾

Algumas doenças estão relacionadas a estas regiões de repetições. Uma expansão dos trinucleotídeos CAG ou GGG, através de uma proteína mutada, pode ocasionar doenças degenerativas. Elas incluem a doença de Huntington, doença de Kennedy, ataxia espinocerebelar tipo 1, doença de Machado-Joseph e síndrome do X frágil.^(22,23)

A expressão do gene do AR tem sido avaliada apenas em ensaios qualitativos ou semi-quantitativos, como o *western blotting* ou o *northern blotting*, ou mesmo ensaios de hibridização *in situ*. Com a introdução da PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR), a avaliação quantitativa da expressão gênica tornou-se possível. Em estudo prévio de nosso grupo⁽²⁴⁾ descrevemos a padronização de um ensaio utilizando qRT-PCR na quantificação da expressão do gene do receptor glicocorticóide, que pode ser aplicada por semelhança à investigação do gene do AR, uma vez que este gene pertence à superfamília dos receptores nucleares,⁽²⁵⁾ com alto grau de homologia e similaridade ao padrão de expressão gênica dos receptores de glicocorticóide.

1.4 Justificativa do trabalho:

A redução do tempo de produção do cabelo pode estar correlacionada com a produção excessiva de dehidrotestosterona⁽⁷⁾ através da ação da 5 alfa redutase e sua interação com o receptor androgênico. O fato da doença se manifestar em mulheres com concentrações normais de testosterona indica a possibilidade de uma hipersensibilidade aos andrógenos

podendo inicialmente estar relacionada a intensidade da conversão da testosterona em DHT e a quantidade de AR presente nos folículos pilosos.

Sendo assim, o desenvolvimento de uma metodologia capaz de quantificar os níveis de AR assim como determinar o número de repetições CAG no gene do AR nas células do folículo piloso são o foco do estudo.

2 OBJETIVOS

- 1- Desenvolver um método de quantificação do RNAm do AR em folículo piloso proveniente do couro cabeludo.
- 2- Determinar e comparar a quantidade de RNAm do AR entre as regiões fronto parietal e occipital.
- 3- Determinar se há diferença entre o número de repetições CAG do gene do AR em pacientes e controles
- 4- Correlacionar a quantificação do RNAm do AR com o número de repetições CAG presentes no exon 1 do gene do AR.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Comissão de Ética:

O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de São Paulo, número 322/08 (Apêndice 1) sendo que as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Casuística

Foram selecionadas 27 pacientes com manifestação da doença com idade entre 23 a 75 anos e média de 47,3 anos.

O grupo controle constou de 21 mulheres sem alopecia com idade entre 18 a 30 anos e média de 21,3 anos.

Foram obtidas do mesmo indivíduo amostras do folículo piloso, tanto de regiões fronto-parietal, quanto da região occipital.

3.2.1 Critérios de inclusão:

Pacientes do sexo feminino, maiores de 18 anos de idade, com alopecia de padrão androgênico graus I, II e III de Ludwig (Anexo1).

3.2.2 Critérios de exclusão:

Pacientes menores de idade, pacientes que fizeram uso de medicamentos que interferiram na secreção ou ação dos esteróides adrenais ou gonadais (flutamida, espironolactona, acetato de ciproterona, drospirenona ou finasteride) nos três meses que

precedem à obtenção da amostra. Também foram excluídas pacientes com outras manifestações clínicas de hiperandrogenismo além da alopecia.

3.3 Coleta das amostras de bulbo capilar

Os cabelos da região fronto parietal e occipital foram coletados numa quantidade aproximada de 10 pelos por região através de tração manual. As amostras foram selecionadas em uma área de aproximadamente 1 cm², sendo feita uma pré seleção dos cabelos quanto a resistência dos fios no couro cabeludo a fim de se obter os folículos de preferência na fase anágena. Feita esta verificação, a obtenção dos cabelos selecionados com os respectivos folículos foi realizada através de um único movimento de tração. Os cabelos com os folículos presentes foram armazenados em tubo específico com solução de armazenamento apropriado (*Trizol Reagent Invitrogen*) e, em seguida, estes fios foram raspados com lâmina de bisturi a fim de expor este substrato a solução de armazenamento para minimizar a degradação do RNA. Em seguida, estas amostras foram armazenadas em Freezer a -80°C.

3.4 Análise bioquímica

Para dosagem dos hormônios, foram obtidas amostras de sangue periférico para a quantificação de DHEA-S (quimiofluorescência), androstenediona (RIE), testosterona total (quimiofluorescência), 17OH Progesterona (RIE) e DHT (radioimunoensáio por extração) obtidas na primeira fase do ciclo menstrual. Estas dosagens foram realizadas pela Nuclimagem – Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

3.5 Análise Molecular

As amostras de bulbo piloso foram submetidas à extração de RNA e à transcrição reversa para a obtenção de DNA complementar (cDNA), o qual foi posteriormente quantificado por PCR em tempo real.

3.6 Extração do RNA

3.6.1 Bulbo capilar (amostras)

Após descongelamento das amostras, foi adicionado clorofórmio. Após centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi precipitada com isopropanol, seguido de etanol 85%. O RNA foi diluído em água livre de DNase e RNase e sua concentração foi determinada por meio de espectrofotometria. Foi adicionado um microlitro de enzima inibidora de RNase (*Applied N8080234*) com armazenamento a -80°C , por um período de no máximo duas semanas, até a realização da transcrição reversa.

3.6.2 Próstata (curva padrão)

A fim de comparar a expressão das amostras do folículo piloso com um tecido que expressa grandes quantidades do AR, obtivemos uma próstata de doador cadáver.

Este órgão foi fragmentado em pequenos pedaços e armazenado a -80°C em solução apropriada. (*RNAlater AM 7021*).

Para realização da curva padrão, foi realizado o descongelamento de parte deste material e, posteriormente, foi realizado o rompimento das células por homogeneização

(*Tissue Disruptor Qiagen*) sendo, em seguida, este material submetido a extração do RNA pelo Kit (*rNeasy Mini Kit - Cat. No. 74104, Qiagen*).

3.7 Reação enzimática de transcrição reversa

Tanto o RNA proveniente de bulbo capilar como o de próstata foram diluídas em 50µl de água ultra pura (*GIBCO*) e submetidos a uma reação enzimática modulada pela ação da transcriptase reversa, permitindo a síntese do DNA complementar (cDNA) à sequência do RNA extraído. A reação contém tampão, dNTPs, iniciadores aleatórios (*Random primers*), transcriptase reversa (*Multiscribe reverse transcriptase*), enzima inibidora de RNase (*RNase Inhibitor*) e o RNA da amostra a ser transcrita.(Tab.1)

TABELA 1 - Componentes para realização da Reação de Transcriptase Reversa (*Kit Taq Man Reverse Transcriptase Reagents N8080234*)

Componentes	Volume /tubo µl
Buffer TaqMan RT 10x	5,0 µl
25nM MgCl₂	11,0 µl
DeoxyNTP	10,0 µl
Randon Primers	2,5 µl
Inibidor de RNase	1,0 µl
Tanscriptase Reversa MultiScribe	1,25 µl
Total Mix	30,75 µl
RNA	19,25 µl
Total	50,0 µl

3.8 PCR em tempo real (RT-PCR)

Diversos métodos de quantificação de RNA ou cDNA por PCR foram descritos, tendo sido sua otimização bastante complexa até o advento da PCR em Tempo Real. Este método explora a atividade 5'→3' exonuclease da *Taq* polimerase, capaz de clivar uma sonda de hibridização não-extensível (Sonda TaqMan) durante a fase de extensão da PCR. Esta sonda de hibridização é marcada com dois fluorocromos. Neste estudo, o fluorocromo utilizado, foi o FAM (6-carboxi-fluoresceína), servindo este como emissor de fluorescência. Seu espectro de onda foi absorvido pelo segundo fluorocromo, que neste estudo foi o TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina). Enquanto a sonda está intacta, ocorre transferência da energia fluorescente do emissor, que é absorvida pelo fluorocromo inibidor. Durante a fase de extensão da PCR, a sonda de hibridização é clivada pela ação nucleolítica 5'→3' da *Taq* polimerase. Com a quebra da sonda, a emissão fluorescente de FAM já não é mais transferida eficazmente para o fluorocromo inibidor, resultando em incremento da emissão fluorescente, que passa a ser detectada a cada ciclo da PCR. (Fig. 2)

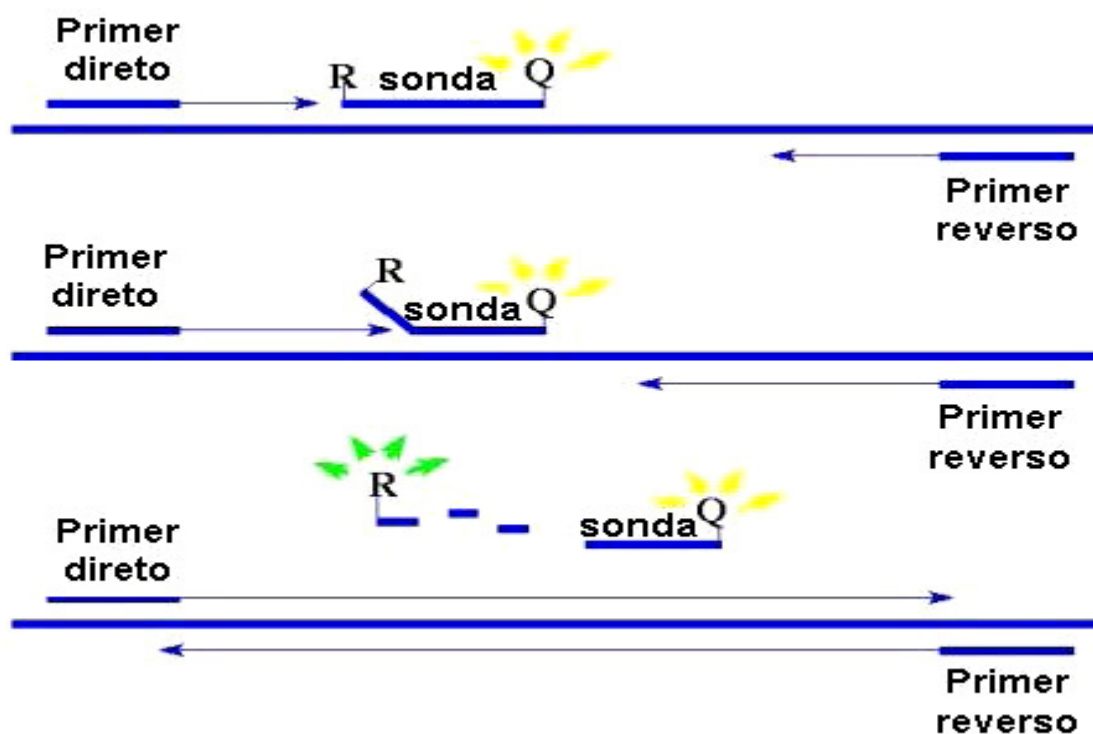


FIGURA 2 – Representação do princípio da PCR em tempo real. A sonda intacta emite apenas fluorescência basal (Q, “quencher”). Com a atividade da *Taq polimerase*, a sonda é clivada e o fluorocromo emissor (R, “reporter”) afasta-se do inibidor (Q, “quencher”), que perde a capacidade de absorver sua energia, permitindo então o aumento da emissão de fluorescência.

O equipamento para PCR em tempo real possui uma câmara CCD (*charged coupled device*) que monitora continuamente a intensidade de fluorescência presente em cada um dos 96 poços do bloco do aparelho. A captação de sinal ocorre durante 25 milissegundos a cada 8,5 segundos, durante a PCR. Um algoritmo computacional calcula a diferença na quantidade de emissão de fluorescência do emissor (*reporter*) com a absorção pelo inibidor (*quencher*), produzindo um valor chamado ΔR_n (R/Q). Portanto o ΔR_n reflete a quantidade de sonda hibridizada que foi clivada pela *Taq DNA polimerase*. O algoritmo calcula a média dos valores ΔR_n coletados nos três últimos ciclos de extensão, produzindo uma representação

gráfica (*amplification plot*), na qual, na abscissa, estão representados os números de ciclos e, na ordenada, está representado o sinal de fluorescência. ⁽²⁶⁻²⁸⁾ (Fig. 3)

Durante os ciclos iniciais (1 a 15) da amplificação por PCR, os valores de ΔRn permanecem em linha basal (*baseline*), ou seja, o sinal é acumulado, mas fica abaixo dos limites de detecção do aparelho. A cada ciclo da reação de PCR durante o qual a *Taq* DNA polimerase sintetiza novas cadeias, sondas correspondentes serão clivadas, resultando em aumento de sinal fluorescente. Os sinais medidos durante os ciclos da PCR são utilizados para demarcar uma linha de corte (*threshold*). A linha de corte é calculada pelo programa, sendo baseada na variabilidade da emissão de fluorescência da linha basal. Isto determina uma linha de corte que corresponde a dez desvios-padrão, acima da média da emissão dos ciclos iniciais. Adicionada a linha de corte, forma-se uma intersecção com a curva de amplificação detectada acima da linha de corte, que corresponde à fase exponencial da reação de PCR. Este ponto é utilizado para definir o ciclo limite (*threshold-cycle* ou *Ct*) de uma amostra. O *Ct* é definido como o número do ciclo da PCR, no qual o sinal fluorescente torna-se significativamente maior do que a fluorescência de base. (Fig. 4) ⁽²⁶⁻²⁸⁾

A quantificação real depende ainda do cálculo de expressão ajustado em relação a um gene normalizador que possui expressão constitutiva, estável e que sirva para corrigir a expressão do gene em estudo para a quantidade total de RNA extraído. A construção de uma curva com quantidades conhecidas de RNA, permite criar um padrão que possa ser repetidamente utilizado para corrigir diferentes ensaios de expressão.

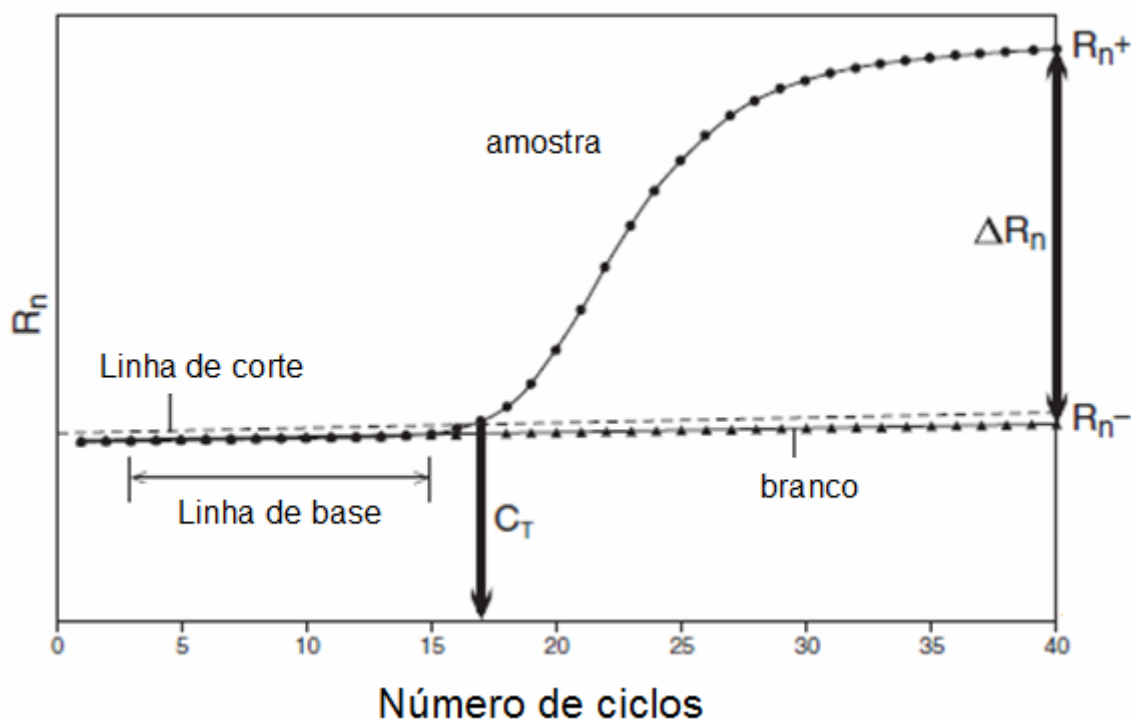


FIGURA 3 - Esquemática demonstrando as fases das quais a rtPCR é caracterizada. A correlação entre o número de ciclos "abscissa" com a fluorescência, "ordenada ΔR_n " resulta na quantificação de RNA da amostra analisada.

3.9 Iniciadores e sondas direcionados ao gene AR

Neste estudo, utilizamos iniciadores *sense* e *antisense* desenhados na transição dos exons 4 e 5 do gene AR e sonda marcada com o fluorocromo 6-FAM.

O desenho dos iniciadores da reação, bem como da sonda para AR, foi baseado em seqüência depositada no NCBI, disponível na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/21322251> acessado pelo OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*): Assay ID (Hs00171172_m1); localização (3293); sonda (FAM5NFQ); seqüência (AGGCCTTGCCTGGCTTCCGCAACTT); símbolo do gene (AR); exons alvo (4-

5); *Amplicon* (72); *NCBI gene reference* (NM_000044); *NCBI SNP reference* (M20132, M21748, M20260, M23263, L29496); *Medline reference* (20296868).

3.9.1 Iniciadores e sondas direcionados ao gene utilizado como normalizador da reação (BCR- *Breakpoint Cluster Region*)

Uma das principais etapas para a análise da expressão gênica por meio de PCR em tempo real envolve a escolha de um gene controle ou normalizador, cuja expressão não tenha variação entre as amostras analisadas. Diversos genes podem ser utilizados para este fim, como o GAPDH, o G6PD e o ABL. Esta escolha pode ser facilitada pela análise do banco de dados de SAGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) ou pelo uso do Kit TaqMan™ endogenous control plate (*Applied Biosystems*). Em nosso estudo, o gene BCR (22q11.21) foi escolhido como normalizador, pois sua expressão é praticamente constante ao longo do tempo e de eficiência de amplificação semelhante ao gene de estudo (AR). A sonda e os iniciadores para o gene normalizador BCR são: Iniciador BCR *Sense*: CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT; Iniciador BCR *Anti-sense*: CCTGCGATGGCGTTCAC; Sonda BCR: 6-FAM-TCCATCTCGCTCATCATCACCGACA-TAMRA; Tamanho do Produto: 67 pb.

3.9.2 A Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de alta claridade óptica (*PCR optical tubes, Applied Biosystems*) específicos para PCR em tempo real. No preparo das reações utilizou-se uma solução-mãe ou mix para cada gene. (Tab. 2)

Tabela 2 - Componentes da reação de PCR em tempo real somados a 5 µl de cDNA.

COMPONENTE	VOL/RX	
MASTER MIX 2X	12.5	} Mix 1
BCR SENSE (30uM)	0.2	
BCR AS (30uM)	0.2	
BCR PROBE VIC (25uM)	0.27	
H2O	6.83	
Volume final	20	
COMPONENTE	VOL/RX	
MASTER MIX 2X	12.5	} Mix 2
ASSAY AR 20X (FAM)	1.25	
H2O	6.25	
Volume final	20	

Os tubos foram colocados no termociclador de tempo real (*7500, Applied Biosystems*).

A programação de temperatura compreende uma ativação inicial da *Taq Gold*, que ocorre a 95°C por dez minutos, seguida da amplificação da seqüência em 40 ciclos de dois estágios: 15 segundos a 95°C para desnaturação das fitas de cDNA, seguidos de 90 segundos a 60°C para anelamento e extensão dos iniciadores. Na fase de extensão, a *Taq Gold*, por meio de sua atividade 5'-exonuclease, desloca e fragmenta a sonda, que emite fluorescência quando o fluorocromo inibidor (TAMRA) se afasta do emissor (6-FAM).

3.10 Construção da Curva Padrão

Esta curva é necessária para obtermos um padrão de amplificação para o cálculo do número absoluto de moléculas das amostras amplificadas. A amostra de cDNA da próstata é diluída de forma seriada para termos concentrações diferentes, sendo elas a pura, 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Para cada ensaio, são utilizadas amostras de cDNA da próstata e dos indivíduos do estudo onde são amplificados o gene BCR e o gene AR. Ao realizarmos a reação de PCR

conseguimos uma quantificação relativa entre os quatro pontos e, assim, atribuir uma unidade de leitura para as amostras do estudo. (Fig. 4)

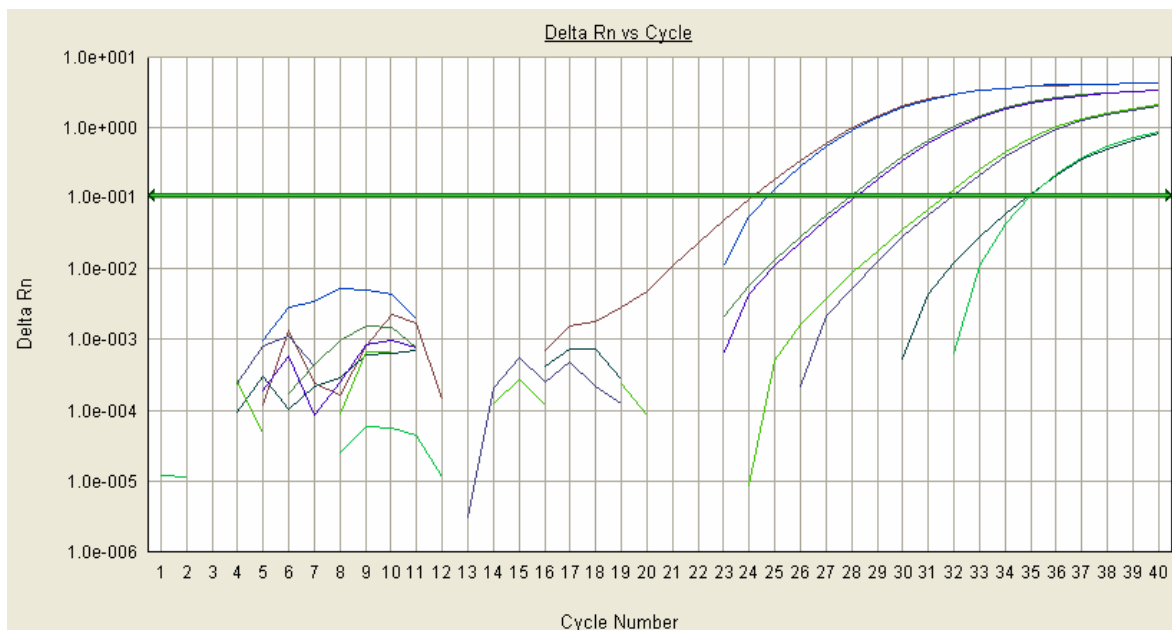


FIGURA 4 - Exemplo de curva padrão: curvas de amplificação em quatro concentrações relativas com amostra em duplicata.

Para cada curva padrão, o software procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R2, inclinação da curva (*slope*). O R2 nos mostra a correlação entre a regressão linear e os dados dos pontos da curva onde, quanto mais próximo de 1 mais fidedigna é a correlação da regressão e os pontos das curvas. (Fig.5)

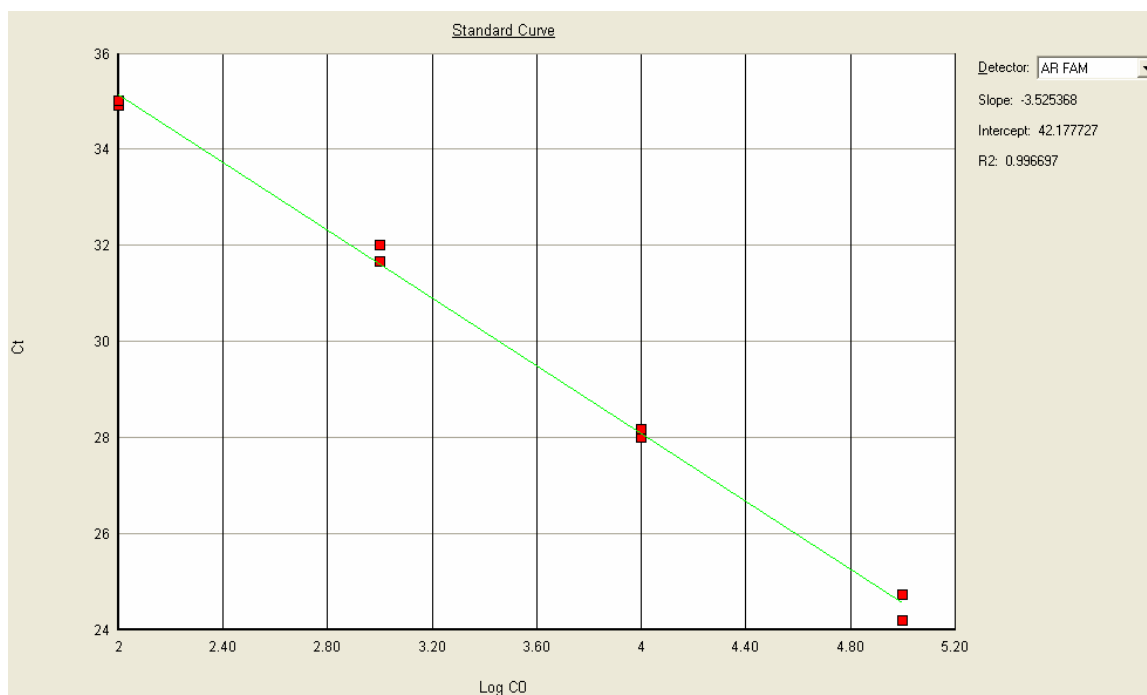


FIGURA 5 - Gráfico de regressão linear em função da curva padrão gerada.

3.11 Cálculo da expressão da amostra

A média dos Cts (*Cycle threshold*) das duplicatas das amostras da região occipital e fronto parietal é corrigida pela média dos Cts da curva padrão (fig.5). Foi realizada a divisão das concentrações (*Mean Qty*) obtidas de ambos os genes para que se possam ser estabelecidos os valores que representam o número de unidades de expressão de AR de cada amostra. (Figs 6 e 7)

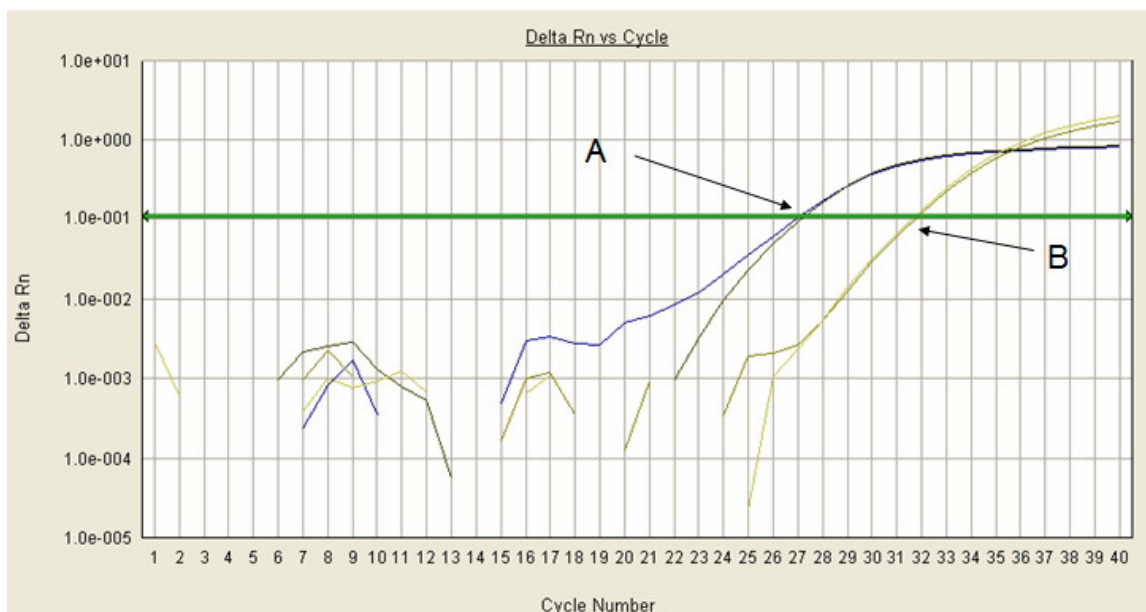


FIGURA 6 - Representação de amplificação das duplicatas do gene BCR (A) apresentando um CT aproximado de 27 e do gene AR (B) apresentando um CT aproximado de 32.

Setup		Instrument		Results				
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report		
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty
A6	36fp	BCR-FAM	Unknown	27.10	0.106	194025.38	187115.13	9772.569
B6	36fp	BCR-FAM	Unknown	27.25	0.106	180204.88	187115.13	9772.569
E6	36fp	AR-FAM	Unknown	31.84	0.073	1067.49	1100.44	46.602
F6	36fp	AR-FAM	Unknown	31.74	0.073	1133.39	1100.44	46.602

FIGURA 7 - Representação de quadro onde são apresentados os valores dos Cts das duplicatas de cada gene. O valor de (*Qty*) de cada amplificação e a média do resultado das duplicatas de cada gene amplificado (*Mean Qty*).

3.12 Genotipagem e sequenciamento

Com a finalidade de correlacionar o número de repetições CAG com a expressão do gene AR, foi realizada a amplificação de um fragmento do exon 1, onde estas repetições estão presentes. Posteriormente, foi realizada a genotipagem deste produto de PCR o que nos permitiu determinar os tamanhos dos fragmentos assim como determinar o padrão de expressão monoalélica e bialélica das amostras. Foram selecionados indivíduos homocigotos para sequenciamento a fim de se determinar o número de repetições CAG do fragmento amplificado. (Fig. 8)

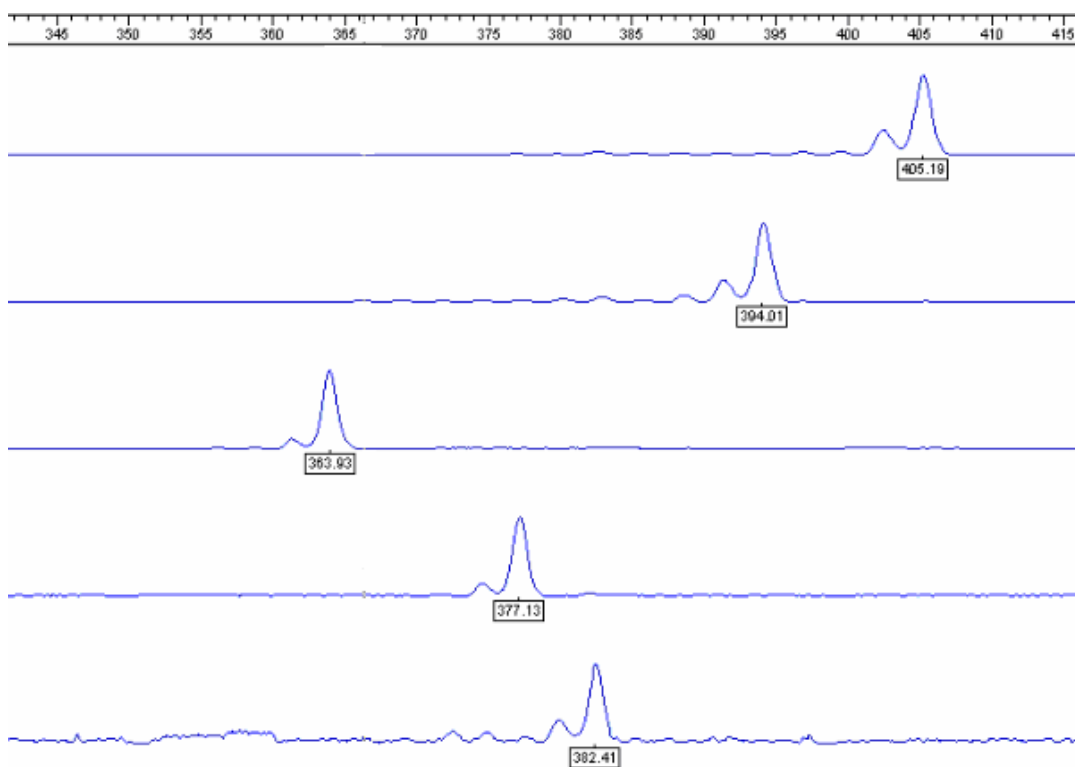


FIGURA 8 - Indivíduos homocigotos selecionados para sequenciamento com seus respectivos tamanhos de fragmentos.

Estas amostras homocigotas sequenciadas foram utilizadas em todas as corridas de genotipagem a fim de se estabelecer, através da Regressão Linear, um padrão de repetição das amostras em cada ensaio. (Fig. 9)

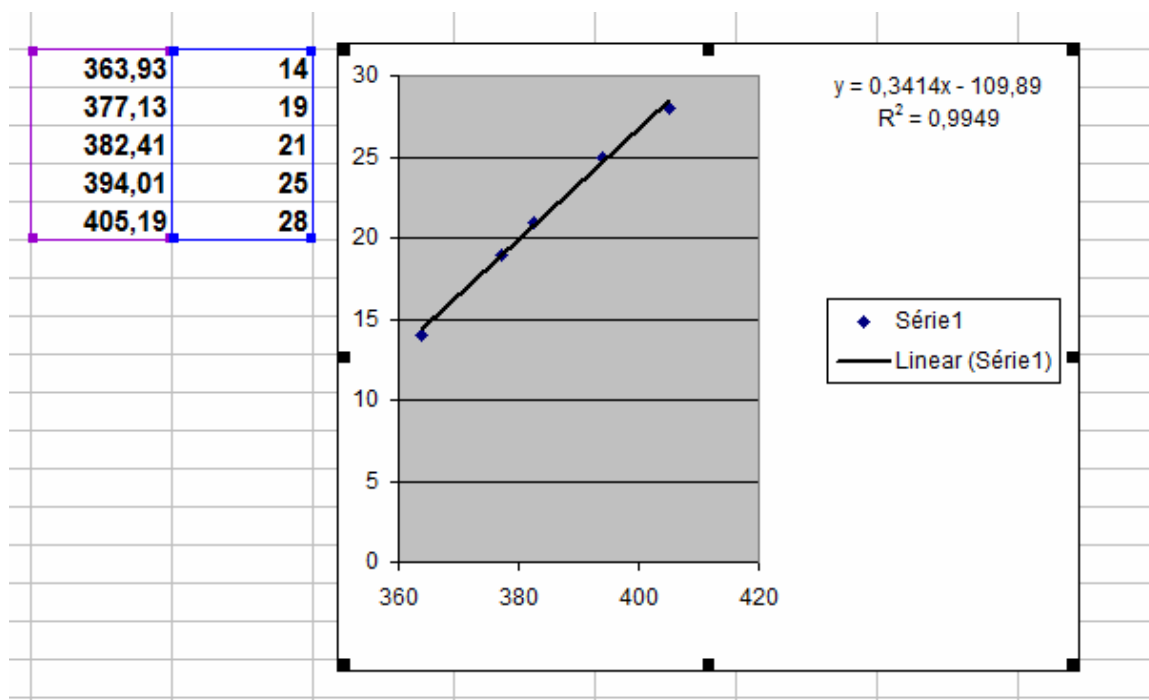


FIGURA 9 - Exemplo de determinação das repetições CAG através de amostras controles homocigotas. Com a utilização da regressão linear obtivemos, em cada corrida, um padrão qualitativo e quantitativo para determinação do número de repetições das amostras avaliadas. Neste exemplo, estes padrões foram ($R^2=0,9949$) e (14, 19, 21, 25 e 28) respectivamente.

3.12.1 Genotipagem:

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foi realizada por meio da PCR a amplificação do fragmento que inclui a região de repetições CAG sendo que o *primer* sense foi marcado na extremidade 5' com o corante fluorescente FAM (*Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Na reação, foram adicionados 5 pmoles do *primer* marcado (GGGTAAGGGAAGTAGGTG) e 20 pmoles do

primer anti-sense não marcado (ACTGCGGCTGTGAAGGTT), em conjunto com 200 µmoles de cada dNTP, tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 100mM, pH 8,3; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM; gelatina 0,01% w/v , 0,5U de Taq DNA polimerase (*Biotoools B&M Labs. S.A., Madrid, Spain*) e água deionizada estéril, completando o volume para 25 µL. Todos os *primers*, inclusive o marcado, foram sintetizados pela Invitrogen™ Life Technologies (*Carlsbad, CA, USA*).

A reação de PCR foi padronizada segundo as seguintes características: 35 ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e extensão final a 72°C por 1 hora, em aparelho ciclador de temperatura (*GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*).

Análise de fragmentos

Depois de realizada a amplificação, adicionou-se a 1 µL do produto da PCR, este diluído 1:7 em ddH₂O, mais 0,5 µL do marcador interno de peso molecular (*GeneScan™ 500ROX™ Size Standard - Applied Biosystems, Warrington, UK*) e 23,5 µL de formamida deionizada (*Hi-Di™ Formamide - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Esta mistura foi desnaturada a (95°C) por dois minutos e mantida em gelo até ser submetida à eletroforese capilar no analisador automático de DNA (*ABI PRISM 310 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os parâmetros da eletroforese capilar foram: temperatura de 60°C e tempo de corrida de 30 minutos por amostra. O resultado foi analisado através do *software Gene Scan (ABI Prism® GeneScan Analysis Software version 3.7 for the Windows NT® Plataform – Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)* e *Genotyper (ABI Prism® Genotyper® 307 NT Software - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)*. (Fig. 10)

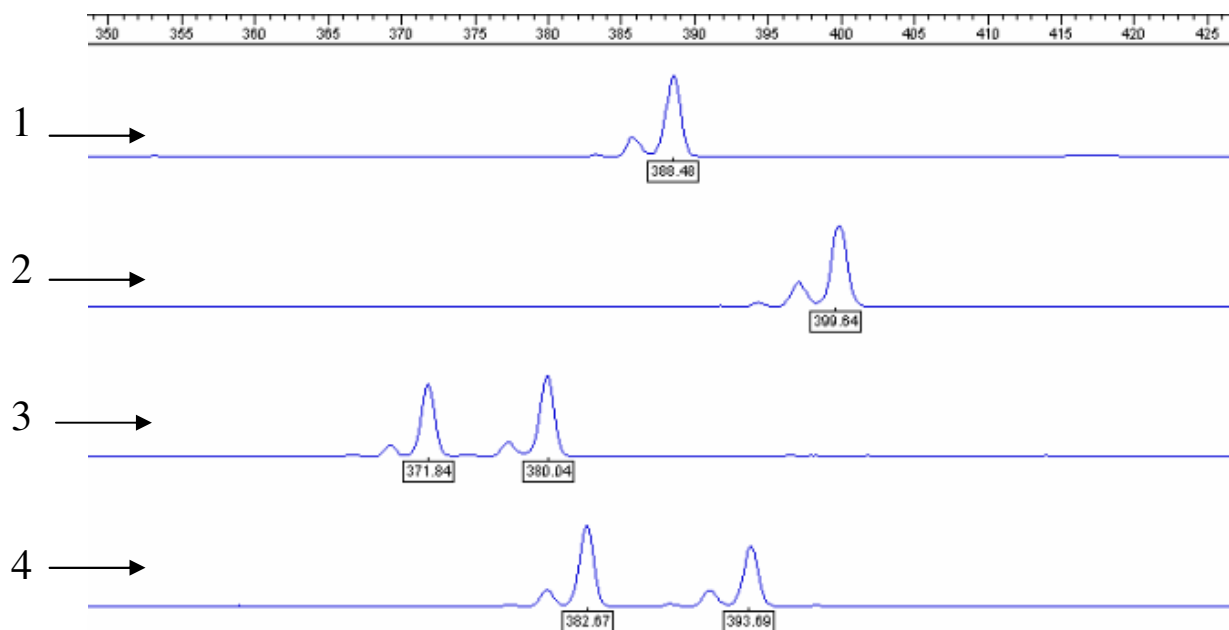


FIGURA 10 - Padrão de corrida de dois indivíduos com expressão monoalélica 1 e 2, e dois indivíduos com expressão bialélica, 3 e 4.

3.13. Sequenciamento automático

Indivíduos homocigotos analisados pelo *software Gene Scan* foram selecionados para sequenciamento a fim de se determinar o número de repetições e assim estabelecer uma referência para a análise dos fragmentos. (anexo 5)

Realizou-se por meio da PCR a amplificação de um fragmento cujo tamanho variou segundo o n° de repetições CAG. (Fig. 11)

agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, submetidos à eletroforese e examinados sob luz ultravioleta (UV). A concentração de DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular (*Low DNA Mass Ladder GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA*).

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados de 3 a 10 ng do produto purificado para um volume final de reação de 10 μ L, contendo 1 μ L de “*Big Dye Terminator Ready Reaction v2.0*” (*ABI PRISM Big Dye terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems Foster City, CA, USA*), 3 μ L do tampão de sequenciamento 5X (*Applied Biosystems Foster City, CA, USA*) e 1,6 pmol de um dos *primers* (sense ou antisense) utilizados na PCR, sendo o volume final completado com água deionizada estéril.

As condições da reação de sequenciamento foram as seguintes: 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, a 50°C por 5 segundos e a 60°C por 4 minutos. Após esta reação, as amostras foram novamente purificadas para eliminação dos nucleotídeos não incorporados. As amostras foram ressuspensas em 15 μ L de Formamida Hi-Di (*Applied BioSystems, Foster City, CA, USA*), desnaturadas a (95°C) por 3 minutos, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese capilar no analisador automático “ABI PRISM 310” (*Applied BioSystems, Foster City, CA, USA*).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o *software SigmaStat for Windows, v.3.5 (SPSS, Chicago, Il; USA)*.

As correlações entre o grau de alopecia e a unidade de expressão dos receptores androgênicos foram realizadas através do teste de regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. A comparação entre a expressão do gene do AR da área afetada com a área controle do mesmo indivíduo foi feita pelo teste t-pareado ou Wilcoxon, de acordo com a distribuição das amostras, e a análise entre os grupos (pacientes x controles) pelo teste T para amostras com distribuição paramétrica ou Mann-Whitney para amostras com distribuição não paramétrica. Foram considerados valores com nível de significância $<0,05$.

5. RESULTADOS

De um grupo inicial de 30 mulheres com alopecia, uma foi excluída por não apresentar quantidades significantes de RNA para análise após a extração e duas foram excluídas por apresentarem, ao quadro clínico, outros sinais de virilização. Portanto, os dados são referentes a 27 pacientes com alopecia. Desse grupo, três apresentaram problemas na genotipagem. Alguma falha na amplificação ou na aplicação das amostras no momento de sua avaliação acabou resultando na ausência de resultados nestas amostras em particular. (Tab. 3)

Das 21 mulheres do grupo controle, duas apresentaram problemas na análise na rtPCR por não amplificarem a região fronto parietal, três por não apresentarem amplificação na região occipital e uma por não apresentar resultado em ambas as regiões analisadas. (Tab. 3)

Tabela 3 - Total de participantes do estudo cujos resultados foram passíveis de análise, tanto para a expressão do AR quanto para genotipagem.

	<i>Número</i>	<i>Avaliados quanto a expressão da região occipital</i>	<i>Avaliados quanto a expressão da região fronto parietal</i>	<i>Indivíduos genotipados</i>
Indivíduos afetados	27	27	27	24
Indivíduos controles	21	17	19	21

5.1 Análise da expressão do gene AR:

Nas mulheres com alopecia, houve diferença entre a expressão da região fronto parietal em comparação à região occipital (Teste t pareado, $p=0,046$). (Fig.12)

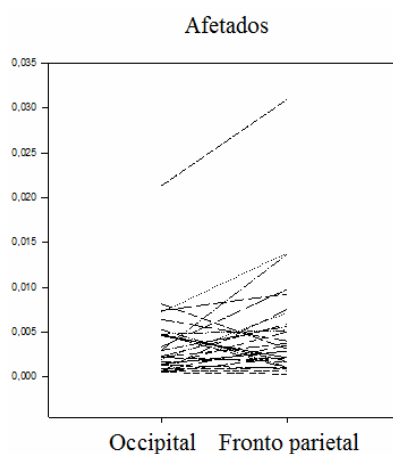


FIGURA 12 – Gráfico da comparação entre as regiões occipital e fronto parietal quanto à expressão do gene AR nos indivíduos afetados.

Nas mulheres do grupo controle, não houve diferença da expressão do AR quanto às regiões fronto parietal e occipital (Mann Whitney, $p=0,326$). (Fig.13)

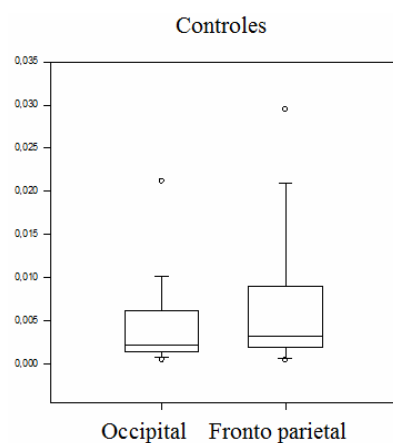


FIGURA 13 - Gráfico da comparação entre as regiões occipital e fronto parietal quanto à expressão do gene AR nos indivíduos controle.

Não houve diferença na avaliação com relação à expressão do AR da região fronto parietal dos indivíduos controle e indivíduos afetados (Mann Whitney, $p=0,672$). (Fig. 14)

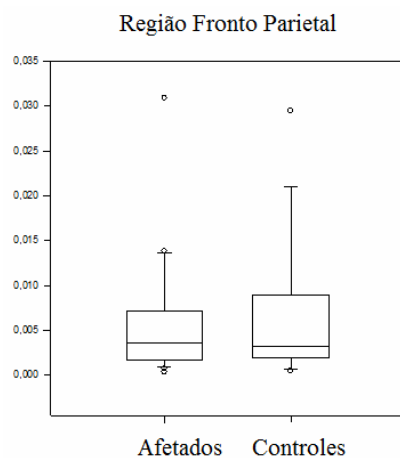


FIGURA 14 – Gráfico da comparação entre indivíduos afetados e indivíduos controle quanto à expressão do gene AR na região fronto parietal.

Não houve diferença na avaliação com relação à expressão do AR da região occipital dos indivíduos controle x indivíduos afetados (Mann Whitney, $p=0,754$). (Fig.15)

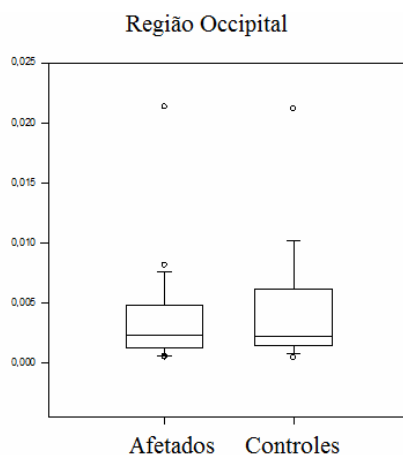


FIGURA 15 - Gráfico da comparação entre indivíduos afetados e indivíduos controle quanto à expressão do gene AR na região occipital.

Não houve diferença na avaliação com relação à expressão do AR entre as regiões occipital e fronto parietal entre todos os indivíduos do estudo. (Mann Whitney, $p=0,143$) (Fig.16)

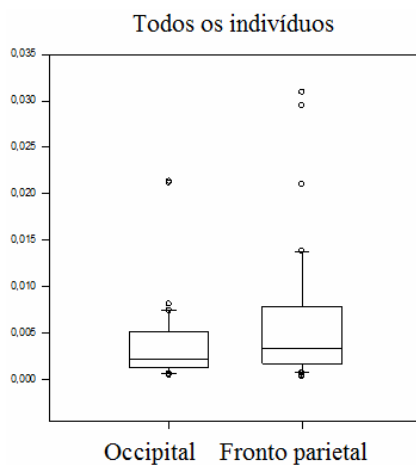


FIGURA 16 - Gráfico da comparação da expressão do gene AR entre as regiões fronto parietal e occipital de todos os indivíduos do estudo.

Houve correlação de expressão do gene entre as regiões fronto parietal e occipital tanto no grupo de pacientes (Regressão linear, $r=0,777$; $p<0,05$), (Fig.17) quanto no grupo controle (Regressão linear, $r=0,912$; $p<0,05$) (Fig.18)

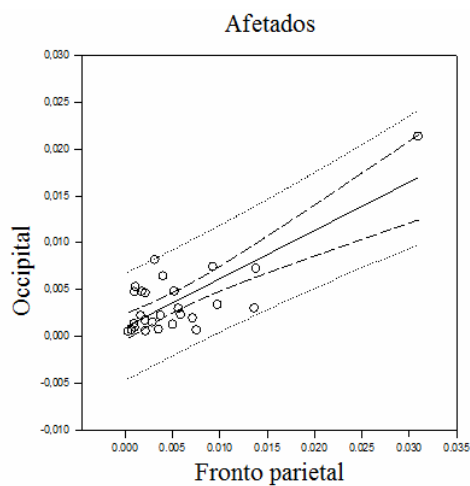


FIGURA 17- Gráfico da regressão linear da expressão do AR entre as regiões fronto parietal e occipital dos indivíduos afetados.

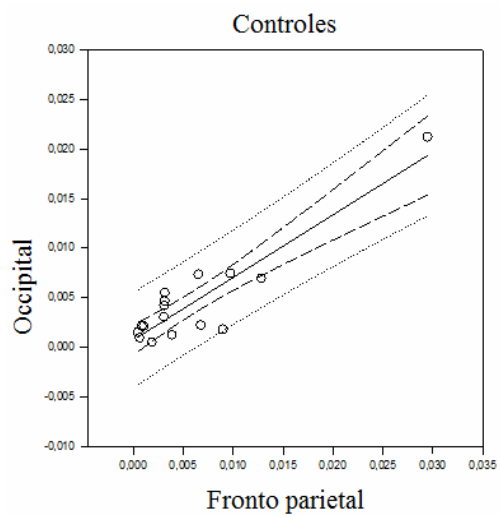


FIGURA 18 – Gráfico de regressão linear das regiões fronto parietal e occipital dos indivíduos controle.

5.2 Análise do número de repetições CAG do exon 1 do gene do AR

No grupo das pacientes com alopecia, foi possível realizar a genotipagem de 24 delas, sendo observada expressão monoalélica em 11 (anexo 3) e bialélica em 13 (anexo 4).

No grupo controle, encontramos expressão monolalélica em 14/ 21 (anexo 6) e bialélica em 7/21 (anexo7), não sendo encontrada diferença entre os grupos (teste z, $p=0,268$).

No grupo de indivíduos com alopecia, o número médio de repetições foi de 21 para o menor alelo e 24 para o maior alelo. No grupo controle, foi de 22 para o menor alelo e 24 para o maior alelo, sendo que não houve diferença entre o número de repetições do grupo afetado em relação ao controle (Mann Whitney $p=0,317$). (Fig. 19)

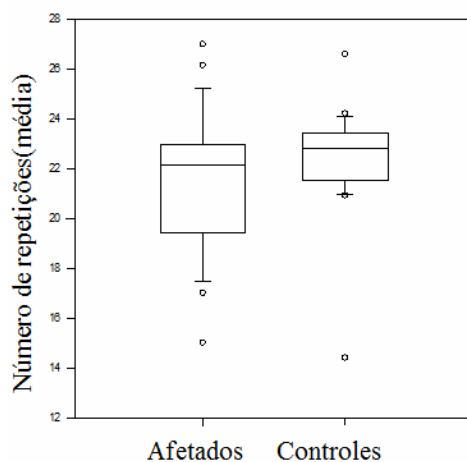


FIGURA 19 - Comparação do número de repetições CAG entre o grupo alopecia e o grupo controle

Ao avaliarmos o número de repetições do alelo 1 (alelo de menor repetição) entre os indivíduos afetados e indivíduos controle, não encontramos diferença (Mann Whitney, $p=0,078$). (Fig. 20)

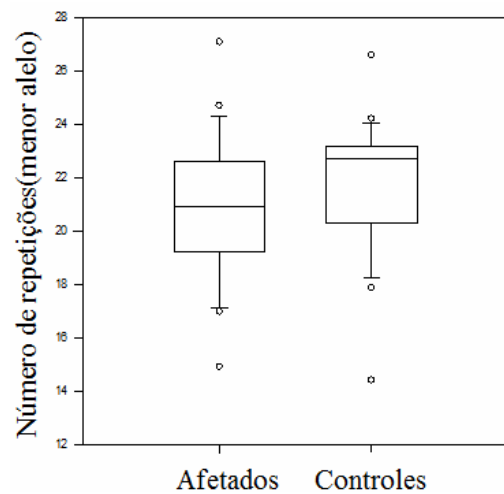


FIGURA 20 - comparação entre os grupos de indivíduos afetados e indivíduos controle quanto ao número de repetições CAG do menor alelo.

5.3. Correlação entre a expressão do gene do AR e o número de repetições CAG

Houve correlação negativa entre a expressão do AR e o número de repetições CAG nas mulheres com alopecia, quando a avaliação foi feita para a média do número de repetições (Regressão linear, $r=0,510$; $p=0,013$) (Fig.21), porém quando avaliamos em relação ao alelo de menor repetição CAG, não houve correlação (regressão linear, $r=0,281$; $p=0,184$). (Fig. 22)

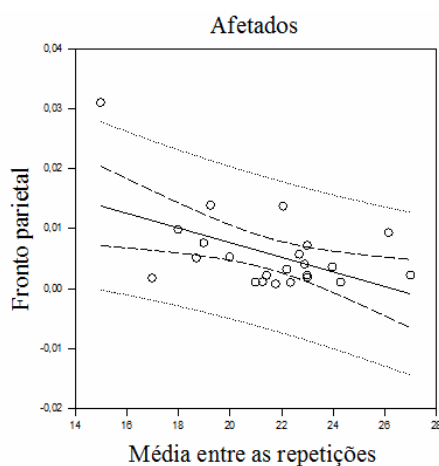


FIGURA 21 - Gráfico de regressão linear entre a média das repetições CAG e a expressão do AR nos indivíduos afetados.

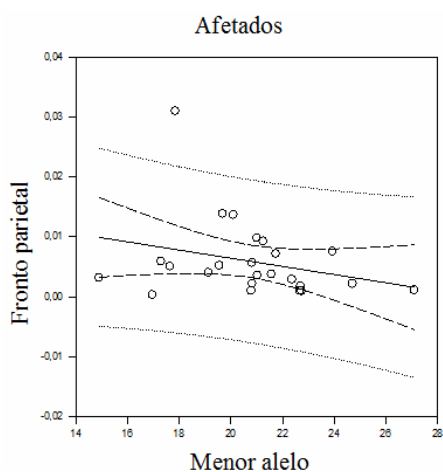


FIGURA 22 – Gráfico de regressão linear entre o número de repetições CAG do menor alelo e a expressão do AR nos indivíduos afetados.

Não houve correlação entre a expressão do AR e o número de repetições CAG no grupo incluindo todos os indivíduos do estudo para a média do número de repetições (Regressão linear, $r=0,173$; $p=0,268$) (Fig. 23) Quando avaliamos o alelo de menor repetição CAG de todos os indivíduos do estudo, com a expressão do AR encontramos correlação negativa. (regressão linear, $r=0,312$; $p=0,042$) (Fig. 24)

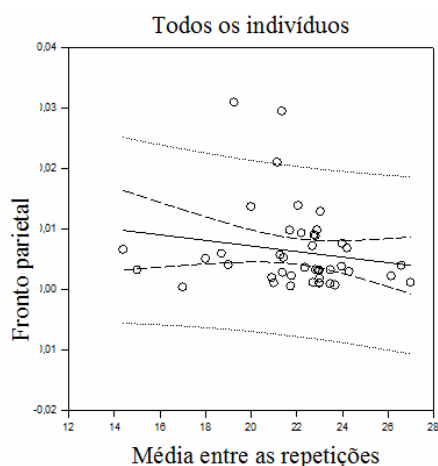


FIGURA 23 – Gráfico de regressão linear entre média das repetições CAG e a expressão do AR, na soma dos indivíduos afetados e indivíduos controle.

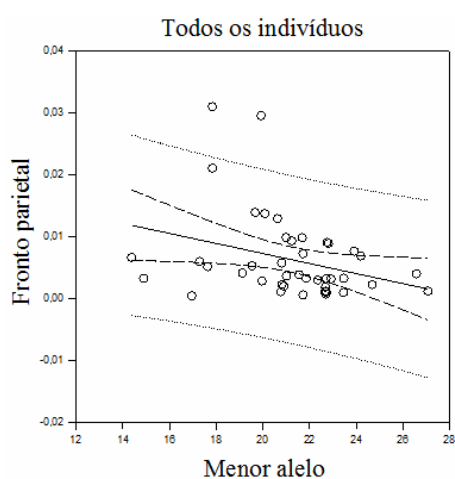


FIGURA 24 – Gráfico de regressão linear entre o número de repetições CAG do menor alelo e a expressão do AR encontrado em todos os indivíduos do estudo.

Não houve diferença entre a expressão do AR nos indivíduos afetados com expressão monoalélica e os de expressão bialélica (Mann Whitney, $p=0,051$). (Fig.25)

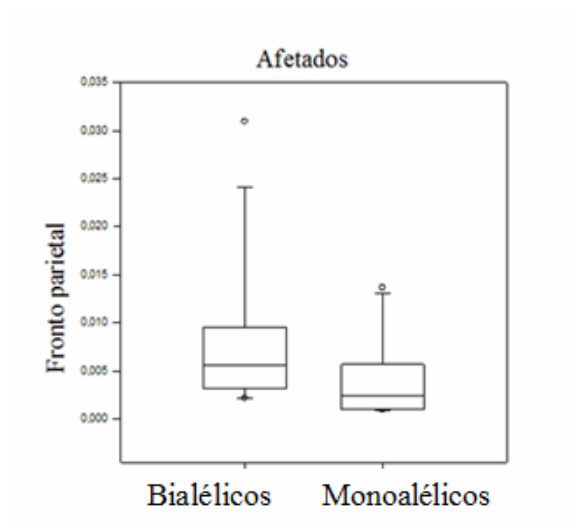


FIGURA 25 – Comparação da expressão do AR entre pacientes com expressão monoalélica e bialélica.

6. DISCUSSÃO

Vários estudos realizados anteriormente demonstraram que a AGA é mediada por andrógenos, porém na maioria dos pacientes, não se observa elevação das concentrações séricas de testosterona total ou livre ou de dihidrotestosterona, fazendo com que a expressão do gene do AR possa ter papel importante na gênese do processo. ⁽⁰⁹⁾

Com relação à proposta inicial de nosso estudo que foi buscar uma forma capaz de quantificar a expressão do gene AR existente no folículo piloso através de uma forma de coleta de material genético aparentemente simples (tração capilar manual), observamos que a metodologia foi eficaz. A forma como foi realizada a obtenção do folículo, armazenamento e extração do RNA se mostrou satisfatória visto que, conseguimos de uma mesma amostra, quantificar um gene normalizador consagrado na literatura (BCR) e também o gene AR. Além disso, a amostra de cDNA obtida através da próstata de doador cadáver apresentou uma expressão significativa do AR, fazendo com que tivéssemos uma ferramenta eficaz para a quantificação deste gene nas amostras de folículo piloso nos indivíduos do estudo através da metodologia da rt PCR.

A avaliação da expressão do gene AR por RT PCR foi realizada de maneira efetiva nos indivíduos afetados, visto que, apenas uma paciente não apresentou amplificação do gene, provavelmente por alguma falha no processo de extração do cDNA. Quando comparada a métodos semi quantitativos como *northern blot* e *southern blot*, esta metodologia mostrou a possibilidade de realizarmos a quantificação da expressão do gene e a genotipagem, partindo de uma mesma amostra de material genético.

Ao analisarmos as mulheres do grupo controle, quanto às regiões fronto parietal e occipital, não encontramos diferença de expressão. No entanto, no grupo das mulheres afetadas, encontramos maior expressão do AR na região fronto parietal reforçando que a

expressão do AR está de certa forma relacionada à miniaturização dos folículos antecipando a queda do cabelo.

Vários autores têm associado o número de repetições CAG presente no exon 1 do gene AR à sua maior ou menor expressão, conforme a quantidade dessas repetições.^(13, 16, 29) Alguns estudos comparando o número de repetições CAG a resposta ao tratamento em pacientes com AGA mostraram que a finasterida foi eficiente em retardar a queda de cabelo em indivíduos com menor número de repetições⁽³⁰⁾ porém, outros autores não encontraram a mesma associação.⁽³¹⁾

Nas nossas pacientes com AGA, houve correlação negativa entre a média da expressão do AR e o número de repetições CAG, sugerindo que, quanto maior o número de repetições menor a expressão.

Kaupert e colaboradores,⁽³²⁾ em estudo realizado em 58 mulheres normais, submeteram amostras de diferentes regiões (folículo piloso de pelos pubianos, folículo piloso de cabelos e leucócitos de um mesmo indivíduo) a digestão pela enzima HPAII com posterior amplificação da região de repetições CAG do gene AR. Estas amostras foram genotipadas e foi encontrada semelhança quanto ao padrão de metilação entre as amostras provenientes do folículo piloso dos cabelos e dos leucócitos.

Em nosso estudo, quando realizada a genotipagem, a frequência de indivíduos homozigotos foi significativamente maior que a encontrada na literatura, no qual esta incidência é de aproximadamente 10%.^(33, 34) No entanto, como a genotipagem foi realizada com cDNA obtido a partir do RNAm do folículo, o que observamos foi uma incidência de 66% de expressão monoalélica nos indivíduos controle e 45,8% nas afetadas, ou seja, o que parecia ser um indivíduo homozigoto era a representação do alelo predominantemente ativo deste tecido (expressão monolélica) e o que se apresentava como um indivíduo heterozigoto, na verdade, representava uma amostra com padrão de expressão bialélica.

Em nível celular, um dos cromossomos X é metilado, portanto inativo. No entanto, com o passar dos anos, podem ocorrer alterações no padrão de metilação e os 2 cromossomos X passam a ser ativos. ^(35,36)

Baseado nos achados do trabalho ⁽³²⁾ com o intuito de determinar se o padrão de expressão monoalélica ou bialélica encontrados em nossas amostras poderiam indicar alteração de metilação, coletamos amostras de sangue periférico de 5 mulheres do grupo controle com padrão de expressão monoalélica para extração do DNA de leucócitos, com propósito de genotipar e comparar os resultados com nossas amostras genotipadas de cDNA provenientes de bulbo capilar.

Destas cinco amostras com expressão monoalélica em bulbo capilar, quando analisado o DNA de leucócitos do sangue periférico, quatro se apresentaram como heterozigotas e apenas uma como homozigota. Estes resultados podem indicar que, nas mulheres normais, o padrão de metilação exclusivo de um alelo seja possível.

Como citado anteriormente, quanto maior a idade das mulheres, maiores são as chances de ocorrer alterações no padrão de metilação. ⁽³⁵⁾ Nesta referência em particular, a partir de amostras de DNA provenientes de sangue periférico, foi detectado um desvio de metilação intenso, (superior 90:10) em 16% das mulheres acima de 60 anos enquanto em mulheres com idade abaixo de 25 anos o desvio de metilação intenso foi observado em 7%.

Em nossos achados, através da análise do RNAm extraídos do folículo piloso, encontramos padrão de expressão monoalélica do gene AR (que representa uma expressão de 100% de apenas 1 alelo) em 54,2% das mulheres afetadas e 33% do grupo controle. Embora parte desta diferença possa estar relacionada às alterações de metilação induzidas pela idade, nosso grupo de pacientes afetadas apresenta média de idade de 47,3 anos e com apenas 5 pacientes com idade igual ou maior que 60 anos e o grupo controle, média de idade de 21,3

anos. Portanto, o fator idade não deve ser o predominante nesta situação de maior expressão monoalélica observada em pacientes com AGA.

Considerando que nossos resultados se baseiam na determinação da expressão monoalélica ou bialélica a partir da análise do RNAm, podemos supor que esta metodologia que mede diretamente o alelo expresso seja mais específica e sensível que os métodos que utilizem a digestão enzimática do alelo não metilado, visto que esta atividade enzimática sofre diversas influências metodológicas que podem induzir a resultados variáveis no reconhecimento do padrão de metilação. Portanto, a quantificação direta do RNAm pode ser mais conclusiva quanto ao padrão de metilação encontrado no gene.

Estudos futuros utilizando quantificação direta do RNAm do AR devem comparar o padrão de metilação em leucócitos com o padrão de metilação em folículos pilosos dos cabelos de mulheres com alopecia. Isto permitirá identificar em heterozigotos se a expressão monoalélica é diferente entre os diferentes tecidos nesta doença.

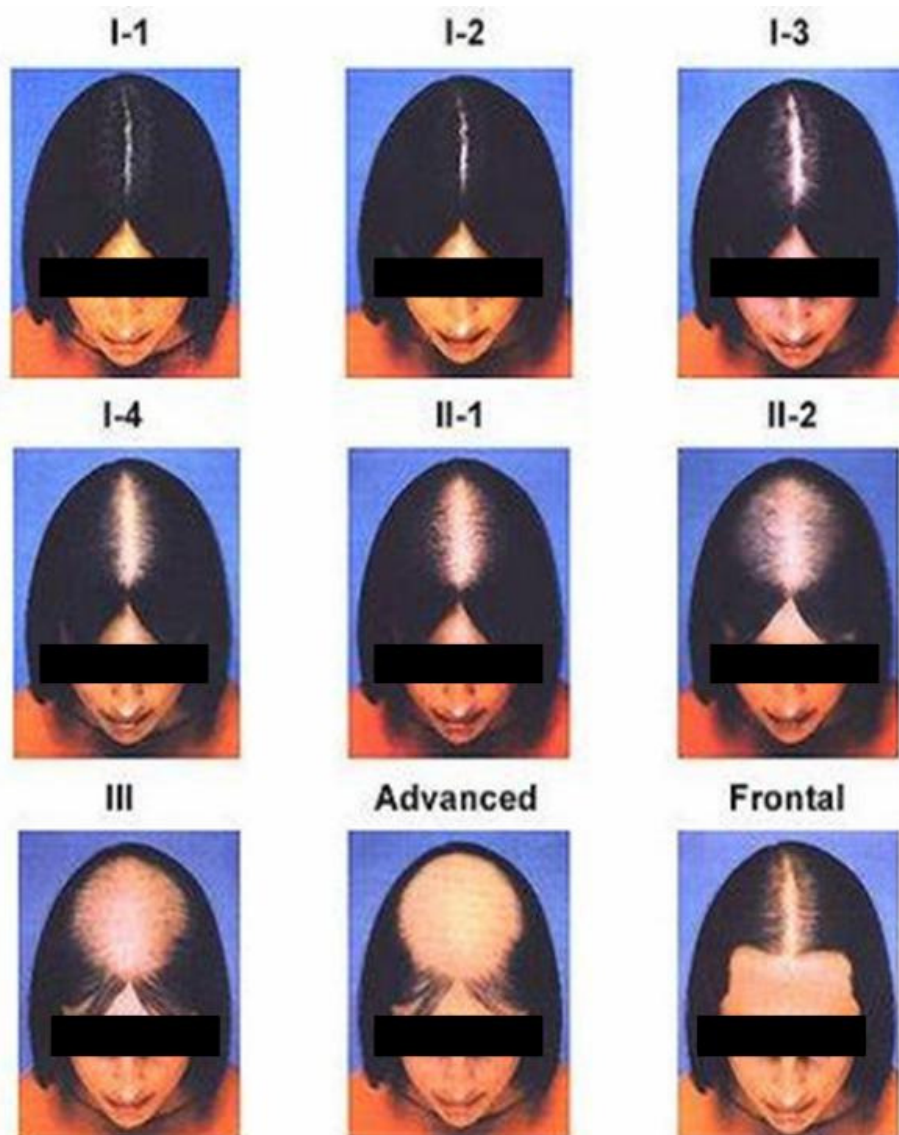
A determinação do número de repetições CAG do gene AR, o padrão mono ou bialélico de expressão, bem como o resultado final da quantificação do RNAm expresso nas células do bulbo piloso, representam marcadores potencialmente úteis no diagnóstico e prognóstico de pacientes com AGA.

7. CONCLUSÃO

- 1) A quantificação do RNAm do AR em células provenientes do folículo piloso do couro cabeludo pode ser determinada de forma precisa e reprodutível utilizando-se a PCR em tempo real.
- 2) Houve diferença entre a quantidade de RNAm do AR entre regiões fronto parietal e occipital.
- 3) A análise do número de repetições CAG do exon 1 do AR realizada a partir de cDNA provenientes de células do folículo piloso do couro cabeludo identificou um predomínio de expressão monoalélica em relação ao esperado.
- 4) Houve correlação negativa entre a expressão do AR e o número de repetições CAG nas mulheres com alopecia.

8. ANEXOS

Anexo 1.



Classificação dos diferentes níveis de alopecia androgenética ⁽³⁷⁾

Anexo 2.

PROTOCOLO ALOPECIA ANDROGÊNICA FEMININAPROTOCOLO N^o. _____

NOME: _____

REGISTRO: _____

IDADE: _____ COR: _____ ESTADO

CIVIL: _____

NATURAL: _____

PROCEDÊNCIA: _____

DURAÇÃO DA

ALOPECIA: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

ALOPECIA: _____

MENARCA: _____ MENOPAUSA: _____

MENSTRUAÇÕES REGULARES: () SIM () NÃO

USO ACO: () SIM () NÃO

QUAL: _____

USO DE OUTRAS MEDICAÇÕES ANTIANDROGÊNICAS: () SIM () NÃO
(ESPIRONOLACTONA, FLUTAMIDA, ACETATO DE CIPROTERONA)

TRATAMENTO PRÉVIOS:

USO TÓPICOS: () SIM () NÃO

QUAL: _____

ANTECEDENTE GESTACIONAL: () G () P () A

OUTRAS DOENÇAS SISTÊMICAS:

OUTRAS MEDICAÇÕES

SISTÊMICAS: _____

EXAME DERMATOLÓGICO:

TIPO DE ALOPECIA () FRONTAL () FRONTO- PARIETAL () DIFUSA

() OCCIPITAL

LUDWIG: _____

FOTOGRAFIA: ____/____/_____

HIRSUTISMO: () SIM () NÃO

ACNE: () SIM () NÃO

OBESIDADE: () SIM () NÃO

SEBORREIA: () SIM () NÃO

EXAMES HORMONAIS

Anexo 3.

Pacientes com alopecia que apresentaram expressão monoalélica quanto ao número de repetições CAG

Repetições (genótipo)	Número de pacientes
15	1 (9,09%)
17	1 (9,09%)
18	1 (9,09%)
19	1 (9,09%)
20	1 (9,09%)
21	1 (9,09%)
23	3 (27,27%)
24	1 (9,09%)
27	1 (9,09%)
Total pacientes	11

Anexo 4.

Pacientes com alopecia que apresentaram expressão bialélica quanto ao número de repetições

CAG

Repetições genótipo	Número de pacientes
17/20	1 (7,7%)
18/21	1 (7,7%)
20/23	1 (7,7%)
20/24	1 (7,7%)
21/22	1 (7,7%)
21/23	2 (15,37%)
21/24	1 (7,7%)
21/25	1 (7,7%)
22/24	1 (7,7%)
22/26	2 (15,37%)
25/28	1 (7,7%)
Total pacientes	13

Anexo 5.

Correlação entre o número de repetições e o tamanho dos fragmentos encontrados no sequenciamento e genotipagem

Repetições	Tamanho do fragmento
14	363,93
19	377,13
21	382,41
25	394,01
28	405,19

Anexo 6.

Indivíduos controle que apresentaram expressão monoalélica quanto ao número de repetições CAG

Repetições genótipo	Número de indivíduos controle
14	1 (7,14%)
21	1 (7,14%)
22	2 (14,28%)
23	8 (57,14%)
24	1 (7,14%)
27	1 (7,14%)
Total	14

Anexo 7.

Indivíduos controle que apresentaram expressão bialélica quanto ao número de repetições CAG

Repetições genótipo	Número de indivíduos controle
18/24	1 (14,28%)
20/23	2 (28,57%)
20/24	1 (14,28%)
21/25	1 (14,28%)
22/24	1 (14,28%)
23/25	1 (14,28%)
Total	7

Anexo 8.

Dados clínicos dos indivíduos afetados pela alopecia e resultados quanto à expressão do gene AR e número de repetições.

Paciente	Idade	Class.Ludwig	DHEAS	SDHEA	DHEA	Androstenediona	Testosterona total	17OH progrest	DHT	AR/BCR/OC	AR/BCR/FP	N Repet. Homozigoto	N repet. Heterozigoto
-1	23							32,6		0,00146547	0,002892	22	26
0	23									0,004743166	0,00100928	21	
4										0,000907553	0,00101607	23	
5	57	2		576	6,9	1,1	46	0,8		0,004772053	0,0017586	23	
9	43	2								0,0019268	0,00714368	22	24
12	55	2		375	8,5	0,6	<20			0,002964903	0,00565507	21	22
14	59	2		154	1,8	0,3	23	0,3	2,8	0,005282381	0,00110381	27	
15	60	2								0,006567599	0,00216728	21	23
18	66				7,5	1,5		1		0,000652327	0,00071169		
20	51	1				1,5		7,5		0,006505434	0,00032781	17	
22	75	1								0,002187212	0,00168016		
23	62	1	172		4,5	0,2	<20	0,3		0,002203233	0,00374857	22	26
25	46	2		684	8	3,7	<20	0,6		0,000712519	0,00354718	21	24
26	24	1								0,001310908	0,00095756	23	
28	46	1	1120		8,2		44	0,8		0,004601416	0,00215636	25	28
29	33	1								0,00741764	0,0026494	21	23
30	46	1								0,008152189	0,00315341	15	
31	24	1	1120	1120	12,5	5,2	68	3,8	2,69	0,021342567	0,03094609	18	21
32	56	1								0,007228424	0,01383044	20	24
33	41	1			788	1,9	<20	0,4	212	0,00300792	0,01365307	20	
34	55	1								0,004788263	0,0051984	20	23
35	36	2								0,001685392	0,0021274		
36	54	2	1360	1360	7,2	2	35	0,9		0,002294071	0,00588109	17	20
37	57	1								0,00125205	0,0050419	18	
39	54	1		1189	2,3	0,6	<20			0,003362721	0,00976481	21	25
40	61	1								0,006412258	0,00402186	19	
41	23	1		1610	5,3	2,6	25			0,000644997	0,00754236	24	

Anexo 9.

Idade dos indivíduos controle e resultados quanto à expressão do gene AR e número de repetições.

Controles	Idade	AR/BCR OC	AR/BCR FP	N repetições Homozigoto	N repetições Heterozigoto
11	21	0,004161773	0,003117278	23	
12	23	0,000896182	0,000651714	23	25
14	18	0,021197939	0,029499672	20	23
16	20	0,000479436	0,001884312	21	
17	20	0,004616744	0,00316586	23	
18	22	0,002113903	0,001070508	23	
19	22	0,001761081	0,009000838	23	
20	22	0,001481963	0,000483558	22	
21	20	0,005473317	0,003176673	22	24
22	21		0,021001738	18	24
23	21			20	24
24	21	0,006923363	0,012841062	21	25
27	30	0,0074204	0,009730971	22	
28	21	0,00135025		23	
29	21		0,008831657	23	
30	20	0,001196977	0,003882694	27	
31	18	0,007309677	0,006536337	14	
121	23	0,002192088	0,006786997	24	
122	22	0,003009976	0,003090402	23	
123	20	0,002087095	0,000871478	23	
124	21		0,002727318	20	23

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sucar DD, Sougey EB, Neto JB. Revista Brasileira de Psiquiatria. Surto Psicótico Pela Possível Interação Medicamentosa de Sibutramina com Finasterida. v.24, n 1. São Paulo, março 2002.
2. Montagna W, Parakal PF. The structure and function of skin. 1974, New York: Academic Press
3. Kligman AM. The human hair cycle. J Invest Dermatol 33:307, 1959
4. Harris MINC. Pele estrutura, propriedades e envelhecimento. Colaboração Maria Edwiges Hoffmann e Adriane Cruvinel – São Paulo – Editora Senac São Paulo 2003 pg (83-6)
5. Alchorne MM, Costa EB. Diagnóstico e Tratamento. Sociedade Brasileira de Clínica Médica 1 edição brasileira 2006 Volume 2 Págs 387-88
6. Rogers, Nicole E, Avran, Marc R. Medical Treatments for Male and Female Pattern Hair Loss. New York. Acesso em 15 set. 2008.
7. Price VH. Androgenetic alopecia in women. J Investig Dermatol Symp Proc. 2003 Jun; 8(1):24-7.
8. Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, Grollier JF. Hair cycle and alopecia. Skin Pharmacol. 1994; 7(1-2):84-9.
9. Inui S, Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. J Dermatol Sci. 2011 Jan; 61(1):1-6. Epub 2010 Nov 3.
10. Chen W, Thiboutot D, Zouboulis CC. Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. J Invest Dermatol. 2002 Nov; 119(5):992-1007.
11. Janne O A, Palvimo JJ, Kallio P, Mehto M. Androgen receptor and mechanism of androgen action Ann Med. 1993 Feb; 25(1):83-9
12. Sui X, Bramlett KS, Jorge MC, Swanson DA, von Eschenbach AC, Jenster G. Specific androgen receptor activation by an artificial coactivator. J Biol Chem. 1999 Apr 2; 274(14):9449-54.
13. Rocha RO, Billerbeck AE, Pinto EM, Melo KF, Lin CJ, Longui CA, Mendonca BB, Bachega TA. The degree of external genitalia virilization in girls with 21-hydroxylase deficiency appears to be influenced by the CAG repeats in the androgen receptor gene. Clin Endocrinol (Oxf). 2007 Sep 4.
14. Zouboulis CC, Degitz K. Androgen action on human skin from basic research to clinical significance. Exp Dermatol. 2004; 13 Suppl 4:5-10.

15. Ibanez L, Ong KK, Mongan N, Jaaskelainen J, Marcos MV, Hughes IA, De Zegher F, Dunger DB. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul; 88(7):3333-8.
16. Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Mar; 84(3): 1091-5.
17. Zitzmann M, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism within the androgen receptor gene and maleness. *Int J Androl.* 2003 Apr;26(2):76-83. .
18. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995 Jun; 16(3):271-321.
19. Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7341-6.
20. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol.* 2002 Oct;16(10):2181-7.
21. Ellis JA, Scurrah KJ, Cobb JE, Zaloumis SG, Duncan AE, Harrap SB. Baldness and the androgen receptor: the AR polyglycine repeat.
22. Ravache M, Abou-Sleymane G, Trottier Y. Neurodegenerative polyglutamine expansion diseases: physiopathology and therapeutic strategies *Pathol Biol (Paris).* 2010 Oct;58(5):357-66. Epub 2010 Mar 29.
23. Rosemberg RN. DNA-triplet repeats and neurologic disease. *N Engl J Med* 1996;335:1222-4.
24. Melo MR, Faria CD, Melo KC, Reboucas NA, Longui CA.. Real-time PCR quantitation of glucocorticoid receptor alpha isoform. *BMC Mol Biol.* 2004 Oct 26; 5(1):19.
25. Faria CDC, Longui, CA. Aspectos Moleculares da Sensibilidade aos Glicocorticóides. *Arquivos Brasileiros de Encocrinologia & Metabologia*, v. 50, p. 983-995, 2006
26. Gibson UEM, Heid, CA, Willians PM. A novel method for real time quantitative rt-pcr. *Genome Res* 1996; 6:995-01.
27. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative pcr: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30:503-12.
28. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Willians PM. Real time quantitative pcr. *Genome Res* 1996; 6:986-94.

29. Sawaya ME, Shalita AR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism, and acne. *Cutan Med Surg*. 1998 Jul;3(1):9-15.
30. Wakisaka N, Taira Y, Ishikawa M, Nakamizo Y, Kobayashi K, Uwabu M, Fukuda Y, Taguchi Y, Hama T, Kawakami M. Effectiveness of finasteride on patients with male pattern baldness who have different androgen receptor gene J *Investig Dermatol Symp Proc*. 2005 Dec;10(3):293-4.
31. Yamazaki M, Sato A, Toyoshima KE, Kojima Y, Okada T, Ishii Y, Kurata S, Yoshizato K, Tsuboi R. Polymorphic CAG repeat numbers in the androgen receptor gene of female pattern hair loss patients. *J Dermatol*. 2010 Nov 2.
32. Kaupert LC, Billerbeck AE, Brito VN, Mendonca BB, Bachega TA. Could the leukocyte x chromosome inactivation pattern be extrapolated to hair bulbs? *Horm Res Paediatr*. 2010; 73(4):238-43.
33. La Spada A.R. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol* 1997; 7(3) 943-63.
34. Rocha RO. Estudo das repetições CAG no exon 1 do receptor de androgenos em pacientes femininas com a forma clássica de hiperplasia congênita da supra-renal por deficiência da 21-hidroxilase. Tese (mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.
35. Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet*. 2000 Oct;107(4):343-9.
36. Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeveva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J Med Genet*. 2008 May;45(5):309-13.
37. Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) arising in the female sex. *Br J Dermatol* 1977; 97: 249-256.

APÊNDICES

Apêndice 1



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Santa Isabel, 305 - 4º andar Santa Cecília CEP: 01221-010 São Paulo – SP
 PABX: 21767000 Ramal: 8061 – Telefax: 33370188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 25 de setembro de 2008.

Projeto nº 322/08
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a) Sr.(a)

Dr. Carlos Alberto Longui

Departamento de Medicina

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **24/09/2008** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Determinação da expressão do receptor androgênico por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) em mulheres com síndromes androgênicas”**, emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive TCLE);**
 Com pendências há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias, (enviar as alterações em **duas cópias**);
 Retirado, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
 Não aprovado: e
 Aprovado (inclusive TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.
Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

JOF

Apêndice 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa cujo título é: DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR ANDROGÊNICO POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL (RT-PCR) EM MULHERES COM SÍNDROMES ANDROGÊNICAS MANIFESTAS POR ALOPECIA.

“Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, projeto nº 322/08”.

Os objetivos deste estudo são: Avaliar a diferença da sensibilidade ao hormônio masculino da raiz dos cabelos.

Se você estiver tomando algum medicamento, você deve informar ao seu médico quais seriam eles antes de assinar este termo de consentimento.

Serão coletadas de sua cabeça amostras de cabelo (mais ou menos 10 fios com o bulbo)

Os resultados dos testes podem vir a nos mostrar a melhor forma de tratamento de acordo com as diferenças hormonais de cada paciente.

É importante que você entenda que nenhuma garantia nem certezas podem ser dadas em relação ao resultado do estudo. É importante também que você entenda que se você optar por não participar, esta decisão não afetará o tratamento que você está recebendo.

Você não será pago por sua participação neste estudo.

Seus dados relativos a esta pesquisa são confidenciais. Seu nome ou outras informações de identificação pessoal não serão usados em nenhum relato nem publicações que venham a resultar deste estudo.

Você não deve assinar este formulário de consentimento a menos que você tenha tido a oportunidade de fazer todas as perguntas e ter esclarecido todas as suas dúvidas. Quaisquer dúvidas que eventualmente possam ocorrer, você poderá entrar em contato com o pesquisador Prof. Dr. Carlos Alberto Longui no telefone (0xx11) 3222-0628.

Consentimento

Li as informações fornecidas neste formulário de consentimento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas elas foram respondidas satisfatoriamente. Assino voluntariamente este consentimento informado, que afirma minha concordância em participar deste estudo, até que eu decida em contrário. Não estou renunciando a nenhum de meus direitos legais ao assinar este consentimento. Recebi uma cópia assinada desta para referência futura.

Paciente

Nome: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Pesquisador

Nome: _____ Data: _____

Assinatura: _____

RESUMO

A alopecia androgenética (AGA) acomete cerca de 40% das mulheres. Os prováveis mecanismos envolvidos incluem o aumento da concentração de andrógenos, aumento da atividade da 5 alfa redutase, aumento da expressão do receptor androgênico (AR) ou polimorfismos do gene do AR. Como a maioria das mulheres com AGA apresentam concentrações de andrógenos normal, acredita-se que outros mecanismos tenham papel importante em sua manifestação. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia capaz de avaliar a expressão tecido-específica do gene do AR em mulheres com alopecia bem como correlacionar a expressão ao número de repetições CAG no exon 1 do gene AR. Foram analisadas 27 pacientes com alopecia e 22 mulheres controle sendo que, foram obtidas do mesmo indivíduo, amostras de RNA do folículo piloso das regiões fronto parietal e occipital. As amostras foram submetidas a RT PCR e genotipagem a fim de se estabelecer a expressão do gene AR e o número de repetições CAG respectivamente. Houve diferença quanto à expressão do AR da região fronto parietal com a occipital nos pacientes, ($p= 0,046$) sendo que a mesma diferença não foi observada nas mulheres do grupo controle. Houve correlação negativa entre a expressão do AR e a média do número de repetições CAG nas mulheres com alopecia. ($r= 0,510$; $p=0,013$). Não houve diferença entre a expressão do AR nos indivíduos afetados com expressão monoalélica e os de expressão bialélica ($p=0,051$), porém esse dado necessita ser comprovado através do aumento da casuística. Não houve diferença do número de repetições entre os pacientes e controles. Concluímos que a metodologia desenvolvida é eficiente e reprodutível para a avaliação a expressão do AR no folículo piloso, e que o aumento da expressão do gene do AR nessa região seja importante fator para a manifestação da AGA.

ABSTRACT

Androgenetic alopecia (AGA) affects about 40% of women. It can be caused by greater androgen secretion, augmented action of 5 alpha reductase, overexpression of androgen receptor gene and polymorphisms of AR gene. Because of no correlation between AGA and serum androgens levels, pathogenic basis of AGA is likely to be mediated through others factors. Therefore, the aim of this study was to develop a methodology capable of assessing tissue-specific expression of AR gene in women with AGA as well as to correlate the expression to the number of CAG repeats in exon 1 of the AR gene. We analyzed 27 patients with alopecia and 22 control women of which were obtained from the same individual RNA samples of hair follicle of fronto parietal and occipital regions. All samples underwent to RT-PCR and genotyping in order to establish AR gene expression and the number of CAG repeats respectively. We found a significant difference of AR expression between fronto parietal and occipital region in patients ($p = 0.046$) but it was not observed in control subjects. There was a negative correlation between the expression of AR and the average number of CAG repeats in women with alopecia ($r = 0.510$, $p = 0.013$). There was no difference between the expression of AR expression in individuals affected with monoallelic and biallelic expression ($p = 0.051$), probably because of the number of our sample. There was no difference in number of CAG repeats between patients and controls. We conclude that the methodology is efficient and reproducible for evaluating the expression of AR in hair follicle, suggesting that the AR is involved with AGA development in women.