

MECANISMOS MOLECULARES NO HIRSUTISMO: EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DO METABOLISMO ANDROGÊNICO NO FOLÍCULO PILOSO E ASSOCIAÇÃO COM O DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

MOLECULAR MECHANISMS ON HIRSUTISM: GENE EXPRESSION OF ANDROGEN METABOLIZING ENZYMES IN SCALP HAIR AND ASSOCIATION WITH ETIOLOGICAL DIAGNOSIS

Isabel O Oliveira^{1,2}, Angela D'Avila¹, Ilma S Brum², Poli Mara Spritzer^{1,2}

ABSTRACT

Androgens are the main hormonal regulators of human hair growth and they are related to clinical conditions such as hirsutism. The aim of this study was to analyze the gene expression of androgen receptor (AR), type 1 and type 2 5 α -reductase isoenzymes (5 α R1 and 2) and type 2 17 β hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD 2) in plucked scalp hairs from hirsute patients and normal subjects. We studied 33 women with hirsutism [20 with polycystic ovary syndrome (PCOS), 13 with idiopathic hirsutism (IH)]; 15 control women; and 10 control men. Hirsutism was assessed by a modified Ferriman-Gallwey method. Hormonal status was assessed between days 2 and 10 of the menstrual cycle or on any day when the patients were amenorrheic. AR and enzymes mRNA levels were estimated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). AR expression was similar in all groups. The gene expression of 5 α R2 was not detected in any hair samples analyzed in this study. No differences were found on 5 α R1 mRNA levels between men and normal women (0.78 ± 0.05 vs. 0.74 ± 0.06 , respectively). 5 α R1 gene expression in the plucked hair cells from scalp of normal women (0.85 ± 0.04), PCOS (0.78 ± 0.05) and IH (0.80 ± 0.06) was also similar. 17 β -HSD2 gene expression in hirsute patients was lower (2.2 ± 0.13 and 2.0 ± 0.15 , for PCOS and IH, respectively) than in normal women (3.1 ± 0.17 , $p < 0.05$), and similar to men (1.8 ± 0.22). In conclusion, these results indicate that there are no changes on 5 α R1 gene expression in the plucked hair cells from scalp, related to gender or hirsutism. The lower expression of 17 β -HSD2 mRNA in scalp hairs of hirsute patients suggests androgen metabolism disturbances with predominance of more potent androgens, as occurs in men.

Key words: androgen receptors, hair follicle, hirsutism, 17 β hydroxysteroid dehydrogenase, 5 α -reductase, polycystic ovary syndrome .

¹ Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brasil.

² Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) e PRONEX 26/98 (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência em Pesquisa).

Correspondência para: Poli Mara Spritzer, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Email: spritzer@ufrgs.br

Este trabalho baseia-se em parte dos resultados de 2 artigos aceitos para publicação: Oliveira et al, Steroids, 2003, no prelo e Oliveira et al, Braz J Med Biol Res, 2003, no prelo

INTRODUÇÃO

O hirsutismo é definido como a presença de crescimento excessivo de pêlos terminais na mulher, em áreas anatômicas características de distribuição masculina. Pode manifestar-se como queixa isolada, em mulheres com ciclos regulares e ovulatórios, denominado de hirsutismo

idiopático (HI) ou como parte de um quadro clínico mais florido, acompanhado de outros sinais de hiperandrogenismo (acne, seborréia, alopecia), virilização (hipertrofia do clitóris, aumento da massa muscular, modificação do tom de voz), distúrbios menstruais e/ou infertilidade ou ainda alterações metabólicas relacionadas com hiperinsulinemia/resistência insulínica. No primeiro

caso, ocorre uma maior sensibilidade da pele aos androgênios, como o Hirsutismo Idiopático¹. Nas outras situações, decorre de um aumento da secreção androgênica dos ovários e/ou adrenais, associado à Síndrome dos ovários policísticos (PCOS), tumores secretores de androgênios, Hiperplasia adrenal forma não-clássica (NC-CAH)^{2,3}.

A fisiopatologia do hirsutismo ainda não foi totalmente esclarecida. Embora a influência dos androgênios no crescimento de pêlos na espécie humana seja indiscutível, o mecanismo de ação, bem como o metabolismo desses hormônios nas células do folículo piloso são processos ainda não completamente estabelecidos. Estudos iniciais apontavam para um papel chave da enzima 5 α -redutase (5 α -R) na gênese do hirsutismo⁴. Entretanto, embora esta enzima seja fundamental para formação de níveis teciduais de dihidrotestosterona (DHT), o aumento da atividade da 5 α -R é insuficiente para explicar, de forma global, essa alteração no crescimento de pêlos^{5-9,1}. Da mesma forma, investigações iniciais sobre o número ou a função de receptores de androgênios (AR) em pele de pacientes hirsutas, não mostraram diferenças daqueles encontrados em mulheres normais^{10,11}. Mais recentemente, a análise de polimorfismos do gene do AR não mostrou correlações com a presença ou ausência de hirsutismo¹²⁻¹⁴, embora a associação do hirsutismo com o processo de inativação do cromossomo X seja defendida em um estudo¹³, mas não evidenciada em outro¹⁴.

Frente a esse quadro de informações ainda incompleto, foi que nos propusemos a investigar mecanismos moleculares do hirsutismo, enfocando a expressão dos genes do receptor de androgênios e de enzimas esteroidogênicas, tais como, a 5 α -redutase tipos 1 e 2 (5 α 1 e 2) e a 17 β -hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (17 β HSD2) em células de cabelos obtidos do escalpo de pacientes hirsutas.

PACIENTES E MÉTODOS

A população do estudo incluiu mulheres com queixa de hirsutismo, que consultaram na Unidade de Endocrinologia Ginecológica do HCPA, durante o período de março de 2000 a março de 2002. Foram selecionadas pacientes com a PCOS ou com HI, sendo excluídas aquelas com NC-CAH, hiperprolactinemia, tumores secretores de androgênios, Síndrome de Cushing, ou distúrbios da função tireóide, conforme descrito anteriormente¹⁵⁻¹⁶.

O diagnóstico de PCOS foi baseado em na presença de hirsutismo, ciclos menstruais irregulares, níveis séricos elevados de LH e/ou da relação LH/FSH, níveis elevados de testosterona (TT) e/ou do índice de androgênios livres (IAL), e evidência ultrassonográfica de aumento bilateral de ovários policísticos, conforme previamente descrito¹⁷⁻¹⁹. O diagnóstico de HI foi baseado na presença de ciclos

menstruais regulares e ovulatórios, níveis séricos normais de androgênios, e sem nenhuma outra doença conhecida²⁰. Trinta e tres pacientes hirsutas foram incluídas, com idade entre 12-42 anos. Estas mulheres ainda não tinham iniciado tratamento hormonal (PCOS= 20; HI= 13).

Foram também incluídos 2 grupos controles: um constituído por 15 mulheres hígidas, com ciclos menstruais regulares (16-37 anos) e outro formado por 10 homens saudáveis (16-29 anos).

O presente estudo foi incluído em um projeto mais amplo, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA e que previa a coleta de sangue para as dosagens hormonais e termo de consentimento informado, que foi obtido de todas as pacientes dos grupos PCOS e HI. Para a coleta dos folículos pilosos, foi obtido consentimento verbal de cada paciente e dos indivíduos dos grupos controle.

PROTOCOLO DE ESTUDO

As medidas antropométricas incluídas no estudo foram: peso corporal, altura, relação cintura-quadril (C/Q = circunferência da cintura registrada no ponto mais estreitado ou na altura do umbigo, e a circunferência do quadril ao nível do grande trocanter), e o índice de massa corporal (BMI = peso corporal em kg dividido pela altura em m²). O escore do hirsutismo foi avaliado pelo método de Ferriman-Gallwey modificado, excluindo as áreas da perna inferior e do ante-braço²¹.

A coleta de sangue foi realizada após uma dieta de 300 g de carboidratos pelo período de 3 dias. A avaliação hormonal e metabólica foi realizada entre os dias 2 e 10 do ciclo menstrual ou em qualquer dia do ciclo quando as pacientes eram amenorréicas. Após jejum de 10 hs, amostras de sangue venoso foram coletadas a partir da veia anti-cubital para determinação dos níveis de glicose e insulina. Amostras de sangue foram também coletadas para a avaliação dos níveis séricos de LH, de FSH, de globulina de ligação de esteróides sexuais (SHBG) e de TT. Todas as amostras foram obtidas entre 8 e 10 horas da manhã. O IAL foi estimado pela fórmula TT: SHBG x 100²²⁻²³.

DOSAGENS HORMONAIS

A Insulina (CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, France) e a TT (ICN, Costa Mesa, CA) foram medidas por radioimunoensaio duplo; a SHBG foi medida por quimioluminescência (DPC, Los Angeles, CA, USA); LH foi medido por ICMA (DPC, Los Angeles, CA) e a glicose por um ensaio colorimétrico (Mega Bayer, Frankfurt, Germany).

PROTOCOLO DE RT-PCR

Fios de cabelos anágenos foram coletados por arrancamento a partir do vértice do escalpo de todos os indivíduos participantes do estudo. As raízes dos fios de cabelos foram cortadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para transporte ao laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia (Depto de Fisiologia, UFRGS), onde foram processadas. A extração de RNA total e a síntese de uma fita-cópia de DNA (cDNA) foram executadas como previamente descrito²⁴. A reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) foi padronizada para cada gene de interesse. O gene da b_2 -microglobulina (b_2 -m), uma proteína expressa de forma constitutiva, foi utilizado para ajustar as quantidades de cDNA de cada amostra.

Os fragmentos amplificados a partir de seqüências do cDNA dos genes de interesse tinham os seguintes tamanhos esperados: 400 pb para o AR²⁵; 827 pb para a 17 β -HSD2²⁶; 368 pb para a 5 α -R1²⁷; 566 pb para a 5 α -R2²⁸; e 627 pb para a b_2 -m²⁹.

Amostras de 15 ml das reações de PCR foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,5-2,0%, e visualizadas em luz UV. As bandas foram quantificadas por análises densitométricas usando um sistema de processamento de imagens (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). A análise semi-quantitativa representa o produto da relação gene de interesse/gene da b_2 -m.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram descritos como médias e desvio padrão (\pm DP) ou medianas e intervalo de confiança de 95%. Comparações entre médias foram analisadas pelo teste t de Student, ou pela análise da variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Duncan; comparações entre mediana foram efetuadas usando o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico SPSS (Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

Os dados clínicos e hormonais das pacientes hirsutas com PCOS e HI são apresentados na tabela 1. Em relação à idade e ao score clínico para hirsutismo, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos de pacientes hirsutas. Por sua vez, pacientes hirsutas com PCOS apresentaram IMC, níveis séricos de TT, IAL e LH maiores que as pacientes do grupo das HI, respectivamente.

As concentrações de SHBG foram menores no grupo das PCOS que no grupo das HI.

Tabela 1. Dados clínicos e hormonais de pacientes hirsutas com a Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) e Hirsutismo Idiopático (HI)

Características	PCOS	HI	P
Idade (anos) ^a	23,0 \pm 1,2	24,3 \pm 1,7	0,524
IMC (kg/m ²) ^a	30,7 \pm 1,4	26,8 \pm 1,1	0,032
C-Q ^b	0,9 (0,8-0,9)	0,8 (0,8-0,9)	0,286
Score clínico /hirsutismo	15,1 \pm 1,3	13,9 \pm 0,9	0,485
Testosterona (ng/ml) ^a	0,89 \pm 0,07	0,64 \pm 0,06	0,017
IAL ^a	15,3 \pm 1,73	8,8 \pm 1,34	0,005
SHBG ^b (nmol/L)	24,4 (13,3-37,3)	33,9 (22,5-45,2)	0,077
Insulina (μ IU/ml) ^b	28,9 (18,1-41,9)	16,6 (12,1-22,8)	0,000
LH ^b IU/L	4,6 (2,8-9,1)	2,7 (2,1-6,6)	0,056

IMC: índice de massa corporal; C-Q: relação cintura-quadril; SHBG: globulina de ligação de esteróides sexuais; LH: hormônio luteinizante.

^a Os valores são expressos como média \pm DP.

^b Os valores são expressos como mediana e intervalo de confiança de 95%.

Os resultados da análise semi-quantitativa dos níveis de mRNA dos genes de interesse estão apresentados na tabela 2. A expressão do gene da 5 α -R2 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas neste estudo por RT-PCR. Conforme pode se observado, a análise da expressão do gene do AR em células obtidas de fios de cabelos do vértice do escalpo de homens (0,79 \pm 0,09), de mulheres normais (0,63 \pm 0,05) e de pacientes hirsutas [PCOS (0,71 \pm 0,03) e HI (0,79 \pm 0,07)] não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Análise semi-quantitativa da expressão dos genes do receptor de androgênios e das enzimas 5

	Homens	Mulheres	PCOS	HI	P
AR	0,79 \pm 0,09	0,63 \pm 0,05	0,71 \pm 0,07	0,79 \pm 0,07	NS
5 α -R1	0,78 \pm 0,05	0,74 \pm 0,06	0,78 \pm 0,04	0,80 \pm 0,06	NS
17 β -HSD2	1,8 \pm 0,22	3,1 \pm 0,17*	2,2 \pm 0,13	2,0 \pm 0,15	<0,05

AR= receptor de androgênios; 5 α -R1= 5 α -redutase 1; 17 β -HSD2 =17 β -hidroxiesteróide desidrogenase 2.

Os valores são expressos como média \pm EPM

Os níveis de mRNA do gene da 5a-R1 em células foliculares do escalpo de homens ($0,78 \pm 0,05$), de mulheres normais ($0,74 \pm 0,06$, $p = 0,690$) e de ambos os grupos de pacientes hirsutas, PCOS ($0,78 \pm 0,04$) e HI ($0,80 \pm 0,06$) também foram similares.

Por outro lado, a expressão do gene da 17b-HSD2 foi significativamente menor em pacientes hirsutas não-tratadas ($2,2 \pm 0,13$ e $2,0 \pm 0,15$, para PCOS e HI, respectivamente), em comparação à expressão detectada em mulheres normais ($3,1 \pm 0,17$, $p < 0,05$), e similar àquela observada em homens normais ($1,8 \pm 0,22$).

DISCUSSÃO

Os androgênios são os principais reguladores hormonais do crescimento de pêlos no homem, estando associados a condições clínicas como o hirsutismo. No presente estudo, nossa atenção foi focada sobre aspectos relacionados ao AR e ao metabolismo androgênico em folículos pilosos obtidos de fios de cabelos anágenos coletados do vértice do escalpo de pacientes hirsutas. As raízes desses fios de cabelos coletados por arrancamento contêm principalmente queratinócitos, os quais formam as bainhas radiculares interna e externa. Uma vez que esse procedimento de coleta não é invasivo, apresenta uma grande vantagem em relação à metodologia de excisão por biópsias. Embora as células de folículos pilosos do escalpo não sejam a melhor opção para o estudo do hirsutismo, existem dificuldades éticas para a coleta de amostras a partir da face de pacientes hirsutas, pois seria necessário um grande número de pelos para se obter RNA suficiente para as análises. Além disso, são encontrados poucos dados na literatura sobre os mecanismos moleculares observados em queratinócitos foliculares do escalpo na presença de hirsutismo. Esta é uma região androgênio-sensível em ambos os sexos, além de ser um local de relativa facilidade para se obter amostras. Portanto, torna-se bastante atrativa a investigação de aspectos do metabolismo de androgênios em queratinócitos foliculares do escalpo, particularmente quando é possível comparar indivíduos com uma exposição endógena a níveis altos (PCOS) ou normais (HI) de androgênios circulantes.

Nossos resultados, através da técnica de RT-PCR, mostraram que a expressão do gene do AR em queratinócitos foliculares do escalpo, não é diferente em pacientes hirsutas, mulheres e homens normais. Outros estudos também não foram capazes de demonstrar uma alteração no número ou na capacidade de ligação do AR em fibroblastos de pele pubiana¹⁰⁻¹¹. Da mesma forma, avaliações de polimorfismos do gene do AR e estudos sobre

processos de inativação do cromossomo X não evidenciaram, até agora, uma participação direta do AR na diferenciação de pacientes hirsutas em relação às mulheres não-hirsutas¹²⁻¹⁴.

A enzima 5a-redutase é responsável pela conversão da testosterona e da androstenediona em DHT e androstenediona, respectivamente. Atualmente são descritas duas isoenzimas da 5a-redutase: a 5a-redutase tipo 1, predominante na pele³⁰ e a 5a-redutase tipo 2²⁸, predominante na próstata.

No presente estudo, os níveis de mRNA da 5a-R1 a partir de folículos pilosos coletados do escalpo de homens e de mulheres normais foram similares, confirmando resultados anteriores³¹⁻³². Em contraste, em amostras de pele pubiana de homens normais foi observada uma maior atividade da 5a-redutase do que em pele pubiana de mulheres normais⁵. É possível, portanto, que a regulação da 5a-redutase seja diferente entre queratinócitos foliculares do escalpo e fibroblastos de pele pubiana de indivíduos normais.

Da mesma forma, não foi encontrada uma diferença significativa entre os níveis de mRNA da 5a-R1 em células foliculares do escalpo de pacientes hirsutas e de mulheres normais. Além disso, pacientes com níveis séricos de androgênios aumentados (grupo das PCOS) apresentaram a mesma expressão gênica da 5a-R1 que aquelas pacientes com níveis normais de androgênios (HI). Embora seja bem conhecido que a 5a-R1 é a isoenzima predominante na pele, os resultados obtidos no presente estudo indicam que níveis circulantes de androgênios provavelmente não contribuem para regular a expressão do gene da 5a-R1 em queratinócitos foliculares do escalpo, sugerindo que a 5a-R1 poderia não ser a isoenzima chave no metabolismo local de androgênios nessa região.

Por outro lado, não foi observada a expressão do gene da 5a-R2 nos queratinócitos foliculares do escalpo dos indivíduos analisados no presente estudo. A maioria dos estudos publicados aponta as células da papila dérmica como o compartimento preferencial de localização da 5a-R2^{26,33}, embora uma reação imune positiva para a 5a-R2 também tenha sido observada em queratinócitos foliculares³⁴.

Neste estudo, não investigamos a expressão gênica das isoenzimas da 5a-redutase em outros compartimentos foliculares, tal como a papila dérmica, porque essas células não estão presentes nas raízes de fios de cabelo coletados pela técnica de arrancamento. As células da papila dérmica são obtidas somente por biópsia, as quais constituem um método invasivo e de maior estresse na coleta. Contudo, seria interessante investigar as isoenzimas da 5a-redutase em células da papila dérmica de pacientes hirsutas, uma vez que foi sugerido que essas células são o alvo direto dos

androgênios, regulando por meio de sinais parácrinos a atividade de outras células do folículo piloso (células da matriz do pêlo, melanócitos, e queratinócitos) ⁹.

Com relação ao gene da 17 β -HSD2, nossos resultados mostraram que, em queratinócitos foliculares do escalpo de pacientes hirsutas não-tratadas, sua expressão foi significativamente menor do que a observada em mulheres normais, mas similar à do grupo controle de homens. Essa isoenzima é responsável pela oxidação da testosterona e da DHT em androstenediona e androstanediona, respectivamente, que são androgênios menos potentes.

Recentemente, um aumento na atividade da 17 β -HSD dependente de estrogênio foi descrito em células das bainhas radiculares de folículos pilosos ³⁵. Esse dado está de acordo com nossos resultados, que demonstram maiores níveis de mRNA de 17 β -HSD2 em queratinócitos foliculares do escalpo de mulheres normais do que de homens normais. Por sua vez, os níveis mais reduzidos de mRNA da 17 β -HSD, detectados no escalpo de pacientes hirsutas não-tratadas, parece promover um aumento na concentração de testosterona dentro das células das bainhas radiculares de folículos pilosos. Isso significa que o ambiente hormonal dos queratinócitos foliculares em pacientes hirsutas está alterado, favorecendo a manutenção de altas concentrações de androgênios mais potentes, à semelhança do que ocorre em homens. Além disso, uma vez que no presente estudo foram analisadas pacientes hirsutas com PCOS (com hiperandrogenemia) e HI (com normoandrogenemia), nossos resultados sugerem que a reduzida expressão do gene da 17 β -HSD2 não é dependente dos níveis circulantes de testosterona. Em ambas as situações, observamos uma regulação para baixo dos níveis de mRNA da 17 β -HSD2, provavelmente determinando um aumento da quantidade local de androgênios ativos, os quais poderiam ser usados como substrato para outras rotas do metabolismo de androgênios.

Em conclusão, a expressão do gene do AR em pacientes hirsutas é similar àquela observada em indivíduos normais de ambos os sexos. A expressão do gene da 5 α -R1 em queratinócitos foliculares do escalpo parece não estar relacionada às diferenças no crescimento de pêlos observadas entre homens e mulheres normais, assim como em pacientes hirsutas. A menor expressão gênica da 17 β -HSD2, em queratinócitos foliculares do vértice do escalpo de pacientes hirsutas, sugere um distúrbio no metabolismo de androgênios com predomínio tecidual de androgênios mais potentes, como ocorre em homens. Estudos longitudinais são necessários para melhor esclarecer o papel da 17 β -HSD2 sobre a patogênese do hirsutismo, e para determinar como diferentes tratamentos influenciam o metabolismo de androgênios nas células foliculares de pacientes hirsutas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azziz R, Carmina E, Sawaya ME. (2000). Idiopathic hirsutism. *Endocr Rev*, 21, 347-362.
2. Dunaif A. (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrinology Rev*, 18, 774-800.
3. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS. (1983). Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab*, 57, 320-326.
4. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. (1974). Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*, 186, 1213-1215.
5. Kuttann F, Mowszowicz I, Schaison G, Mauvais-Jarvis P. (1977). Androgen production and skin metabolism in hirsutism. *J Endocrinol*, 75, 83-91.
6. Mowszowicz I, Melanitou E, Doukani A, Wright F, Kuttann F, Mauvais-Jarvis P. (1983). Androgen binding capacity and 5 α -reductase activity in pubic skin fibroblasts from hirsute patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 56, 1209-1213.
7. Lobo RA, Goebelsmann U, Horton R. (1983). Evidence for the importance of peripheral tissue events in the development of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 57, 393-397.
8. Serafini P, Lobo RA. (1985). Increased 5 α -reductase activity in idiopathic hirsutism. *Fertil Steril*, 43, 74-78.
9. Randall VA. (1994). Androgens and human hair growth. *Clinical Endocrinology*, 40, 439-457.
10. Eil C, Cutler GB, Jr., Loriaux DL. (1985). Androgen receptor characteristics in skin fibroblasts from hirsute women. *J Invest Dermatol*, 84, 62-65.
11. Mowszowicz I, Melanitou E, Kirchoffer MO, Mauvais-Jarvis P. (1983). Dihydrotestosterone stimulates 5 α -reductase activity in pubic skin fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 56, 320-325.
12. Legro RS, Shahbahrani B, Lobo RA, Kovacs BW. (1994). Size polymorphisms of the androgen receptor among female Hispanics and correlation with androgenic characteristics. *Obstet Gynecol*, 83, 701-706.
13. Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. (1999). Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1091-1095.

14. Calvo RM, Asuncion M, Sancho J, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. (2000). The role of the CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of skewed X-chromosome inactivation, in the pathogenesis of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 1735-1740.
15. Spritzer P, Billaud L, Thalabard JC, Kuttan F, Mauvais-Jarvis P. (1990). Cyproterone acetate versus hydrocortisone treatment in late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, **70**, 642-646.
16. Spritzer P. (2002). Revisitando o Hirsutismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, **46**, 127-136.
17. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J, Jacobs HC. (1985). Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet*, **2**, 1375-1379.
18. Herter LD, Magalhaes JA, Spritzer PM. (1996). Relevance of the determination of ovarian volume in adolescent girls with menstrual disorders. *J Clin Ultrasound*, **24**, 243-248.
19. Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E. (2001). Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod*, **16**, 1340-1346.
20. Spritzer PM, Lisboa KO, Mattiello S, Lhullier F. (2000). Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **52**, 587-5.
21. Ferriman DG, Gallwey JD. (1961). Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*, **21**, 1140-1148.
22. Spritzer P. (2001) Mechanism of action of antiandrogens. In: Killick S, editor. *Antiandrogens in gynaecology. Gynecology Forum*, 9-11.
23. Maturana MA, Spritzer PM. (2002). Association between hyperinsulinemia and endogenous androgen levels in peri- and postmenopausal women. *Metabolism*, **51**, 238-243.
24. Silva ISB, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM (2001). Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocrine Research*, **27**, 153-169, 2001
25. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. (1988). Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*, **240**, 324-326.
26. Ando Y, Yamaguchi Y, Hamada K, Yoshikawa K, Itami S. (1999). Expression of mRNA for androgen receptor, 5alpha-reductase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells. *Br J Dermatol*, **141**, 840-845.
27. Chen W, Zouboulis CC, Fritsch M, Blume-Peytavi U, Kodelja V, Goerdts S, Luu-The V, Orfanos CE (1998). Evidence of heterogeneity and quantitative differences of the type 1 5a-reductase expression in cultured human skin cells: evidence of its presence in melanocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, **110**, 84-89.
28. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW (1991). Deletion of steroid 5a-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, **354**, 159-161.
29. Taplin ME, Bublej GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*, **332**, 1393-1398.
30. Andersson S, Bishop RW, Russell DW (1989). Expression, cloning and regulation of steroid 5a-reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 16249-16255.
31. Schweikert HU, Wilson JD (1974). Regulation of human hair growth by steroid hormones. I. Testosterone metabolism in isolated hairs. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **38**, 811-819.
32. Takayasu S, Wakimoto H, Itami S, Sano S (1980). Activity of testosterone 5a-reductase in various tissues of human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, **74**, 187-191.
33. Asada Y, Sonoda T, Ojima M, Kurata S, Sato T, Ezaki T, Takayasu S (2001). 5a-reductase type 2 is constitutively expressed in the dermal papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 2875-2880.
34. Bayne EK, Flanagan J, Einstein M, Ayala J, Chang B, Azzolina B, Whiting DA, Mumford RA, Thiboutot D, Singer II, Harris G (1999). Immunohistochemical localization of types 1 and 2 5a-reductase in human scalp. *British Journal of Dermatology*, **141**, 481-491.
35. Niiyama S, Happle R, Hoffmann R. (2001). Influence of estrogens on the androgen metabolism in different subunits of human hair follicles. *Eur J Dermatol*, **11**, 195-198.