**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

SILVIA HELENA PEREIRA VERGILI SGARBOSA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA
DA MUCOSA DE PALATO DURO EM PACIENTES PORTADORES DE
SÍNDROME DE APERT**

**BAURU
2009**

SILVIA HELENA PEREIRA VERGILI SGARBOSA

**ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA
DA MUCOSA DE PALATO DURO EM PACIENTES PORTADORES DE
SÍNDROME DE APERT**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de doutor em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral
Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Co-orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia
Fraga de Almeida

BAURU

2009

Sgarbosa, Silvia Helena Pereira Vergili
Sg72a Análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica
da mucosa de palato duro em pacientes portadores de
síndrome de Apert / Silvia Helena Pereira Vergili
Sgarbosa. -- Bauru, 2009.
142p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução parcial ou total desta tese, por processos
fotocopiadores ou outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética HRAC/USP
Protocolo nº 020/2006
Data: 03/03/2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedicatória

Ao meu querido Deus,

De todo o meu coração, eu quero agradecer-lhe. A sabedoria, a paciência, a perseverança, a alegria e a força que tive para realizar este trabalho, são atributos do Senhor, que em sua infinita misericórdia decidiu compartilhar conosco. Eu não seria capaz se o Senhor não tivesse colocado pessoas tão especiais e capazes ao meu lado.

Ao meu amor Fábio,

O que posso dizer? Sabemos onde isso tudo começou e que se não fosse sua doce insistência eu não teria saído dos trilhos. Só posso agradecer por acreditar que eu poderia recomeçar e por ser a peça fundamental para o término deste trabalho. Obrigada por sonhar comigo!

Aos meus filhos Gabriel e Felipe,

Vocês foram extremamente pacientes comigo durante este período. Eu não terminaria tão bem se não fossem os momentos de extrema alegria e descontração que vocês me proporcionaram. Se o céu der falta de dois anjos, sei onde encontrá-los.

Hoje não vou ligar o computador e vamos comer muito bolo de chocolate!

À minha querida mãe,

Obrigada por todos os princípios de caráter e determinação que você e o papai me proporcionaram. Se cheguei até aqui é por que você se empenhou muito, e esta é uma maneira de honrar todo seu esforço. Dedico este trabalho a você, mãe querida!

À minha irmã Sandra,

Seu exemplo de profissionalismo sempre foi estimulante para mim. Obrigada pela compreensão, pela força, pelo estímulo que só as irmãs podem dar!

A toda minha família,

Pelo apoio e compreensão nos momentos de distância e estresse. Obrigada pela paciência ao ouvirem por tanto tempo a palavra “doutorado”.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro,

Poucas pessoas conseguem unir a razão ao coração de uma maneira tão produtiva. Meu sincero agradecimento à presença humana e científica inesquecível, capaz de polarizar convergências, agregar e somar capacidades, preenchendo o modelo de mestre e orientador. Agradeço pela confiança, pela disponibilidade e pelo constante bom humor e otimismo dispensados durante todo este trabalho. Foi uma honra!

À Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida,

Grande incentivadora, exemplo de humildade, virtude própria dos sábios. Sua postura, seu compromisso científico e disposição para desafiar terrenos pioneiros são exemplos a serem seguidos.

Agradecimentos

Prof. Dr. Luis Fernando Pegoraro, diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru- USP.

Prof. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, presidente da Comissão de Pós-Graduação da faculdade de Odontologia de Bauru- USP.

Prof. Dr. Antonio Carlos Marconi Stipp pela oportunidade, pela avaliação inicial das lâminas, pela amizade, pela convivência enriquecedora, pelas longas conversas.

Prof Rumio Taga pelas correções, por auxiliar no delineamento da pesquisa, oferecendo todo suporte técnico do laboratório de histologia para a concretização deste trabalho. Poucas palavras, muita sabedoria.

Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris pelo auxílio nas análises estatísticas.

Profa. Dra. Cristina Maeda Takia, pela análise das lâminas e laudo inicial do tecido.

Profa. Dra. Vanessa Soares Lara por gentilmente ceder os blocos dos arquivos de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru e por ser gentil sempre.

Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro por ceder cortes histológicos para o grupo controle.

Prof. Dr. Cleverson Teixeira Soares pela amizade e pelo auxílio na análise e fotos das lâminas.

Tânia Mary Cestari tão atenciosa, dedicada e incansável. O que seria dos pós-graduandos sem seu bom humor, prontidão e competência.

Daniele Santi Ceolin pela execução das lâminas, pela paciência ao me ensinar as técnicas histológicas, pela calma e otimismo contagiantes.

Cristina Jardelino – Minha amiga oculta, grande contribuição deste trabalho no processamento histoquímico, imunohistoquímico e análise do picrossírius, sempre pronta a responder a multidão das minhas dúvidas.

Márcia Graeff pela prontidão e gentileza na captura das imagens pelo confocal.

Ariadne Machado Gonçalves Letra pela amizade e auxílio na etapa inicial e tradução deste trabalho.

Vera Lúcia Ruffino Rosa pela amizade, dedicação e energia inesgotável. Vou levar seu exemplo para sempre.

Dalva Ribeiro de Oliveira pelo auxílio em todas as questões burocráticas e pela gentileza em sempre me atender.

Amigos da pós-graduação por dividirem conhecimentos, compartilharem dificuldades, somarem experiência.

Cabo Alcides, por me proporcionar mais saúde, um maior fluxo sanguíneo ao meu cérebro para o término deste trabalho e pela realização do sonho de completar uma corrida de rua.

Lea dos Santos Sanches por ser a retaguarda do meu lar, sempre e principalmente nos momentos de maior estresse.

Amigos Érika e Milton, Renata e Fernando, Andréa e Alexandre, Josiane e Paulo, Karina e Ricardo. Não há outro lugar que eu deseje estar às terças-feiras senão com vocês. Obrigada pela amizade!

Aos pacientes portadores de síndrome de Apert e seus familiares, meu agradecimento especial por tornarem possível essa pesquisa.

*“Para descobrir novos caminhos é
preciso sair dos trilhos.”*

Albert Einstein

RESUMO

Avaliou-se a mucosa de palato duro de indivíduos portadores de síndrome de Apert, atendidos no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo. Doze indivíduos foram submetidos à gengivectomia de tecido exuberante da mucosa palatina para colocação de bandas e acessórios ortodônticos. Os tecidos excisados foram submetidos à análise histológica, morfométrica, histoquímica (PAS, Alcian Blue e Picrossírius) e imunohistoquímica, para observação da proliferação celular com a proteína P63 e identificação de colágeno I e III e decorina. A análise histológica evidenciou epitélio hiperplásico, conjuntivo com áreas de fibras colágenas espessas de trajeto mais linear com fibrócitos em seu interior, áreas com menor número de fibras e marcante presença de fibroblastos, diferente da arquitetura do grupo controle. Os resultados da morfometria não mostraram diferença significativa entre a proporcionalidade dos componentes do tecido conjuntivo nos indivíduos com síndrome de Apert e de indivíduos do grupo controle. Os aspectos histoquímicos evidenciaram que os indivíduos com a síndrome apresentaram maior acúmulo de glicosaminoglicanas em relação ao grupo controle. A coloração de picrossírius, analisada por microscópio confocal e pelo sistema de análise de imagem Image-Pro-Plus evidenciou a presença de fibras colágenas mais espessas nos indivíduos portadores de síndrome de Apert, mas não mostrou diferença significativa entre os dois grupos. A correlação da área ocupada pelas fibras colágenas com a idade dos indivíduos não foi significativa. Os resultados da imunohistoquímica confirmaram a presença de colágeno I e III no tecido Apert, sem evidenciar a atividade proliferativa dos fibroblastos. A maioria dos cortes não evidenciou a imunomarcagem para decorina. Conclui-se que o aumento de volume na mucosa palatina em indivíduos portadores de síndrome de Apert é decorrente do crescimento tecidual sem o predomínio de qualquer um dos componentes do tecido conjuntivo, apesar de os indivíduos com a síndrome apresentarem uma arquitetura diferente das fibras colágenas e maior acúmulo de glicosaminoglicanas.

Palavras-chave: Acrocefalosindactilia. Mucosa Bucal. Palato. Histologia.

ABSTRACT

Histological, histochemical and immunohistochemical analysis of the hard palate mucosa in patients with Apert syndrome

The aim of this study was to evaluate the oral mucosa of patients with Apert syndrome attended at the Hospital of Rehabilitation and Craniofacial Anomalies. The gingivectomy was realized in twelve patients with gingival lateral swellings targeting orthodontic accessories. The specimens were submitted for histological, morphometric, histochemistry (PAS, Alcian Blue, picrossirius) and immunohistochemistry analysis to evaluate cell proliferation with P63 protein, and identification of the collagens I and III and decorin. The histological analysis showed a hyperplasic epithelium, areas of thick collagen fibers in the connective tissue with inactive fibroblasts, different that revealed in the control group. The proportion of the components of the connective tissue between the Apert's syndrome and the control groups wasn't statistical significant. The histochemicals features showed a high concentration of glycosaminoglycans in the connective tissue of Apert's syndrome compared with that revealed in the control group. The picrossírius stained, in the confocal microscope and in the Image Pro-Plus system showed the presence of dense collagen fibers in the Apert's syndrome group, but the statistical analysis wasn't significant between the both groups. The correlation between the collagen area and the age of the patients wasn't statistically significant. The analyses in the Apert syndrome group confirmed the presence of type -I and -III collagen and no proliferative activity of fibroblasts. The decorin staining was absent in almost all the specimens. We conclude that in Apert's syndrome gingival lateral swellings is a secondary outcome and is independent of a increase in the connective tissue components; the collagen fibers, and the glycosaminoglycans gathering found in the Apert syndrome patients were structurally different.

Key words: Acrocefalosyndactyly. Oral mucosa. Palate. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura do FGFR e as isoformas de FGFR geradas por sítios de ligação alternativos.....	47
Figura 2 –	Substituições específicas entre os domínios Ig II e III envolvendo os aminoácidos adjacentes Ser252Trp ou Pro253Arg no FGFR2.....	56
Figura 3 –	Fotomicrografias de tecido palatino de indivíduo normal (A) exibindo fibras colágenas de trajeto ondulado em várias direções. Mesmo tecido de indivíduo portador de síndrome de Apert (B), o qual apresenta feixes de fibras colágenas mais calibrosos com trajetória mais linear (F) tomando um aspecto mais tendinoso que o tecido de indivíduo normal. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE) 40x.....	77
Figura 4 –	Fotomicrografias de tecido palatino de um mesmo paciente, portador de síndrome de Apert, evidenciando (A) áreas com predominância de feixes de fibras colágenas seccionadas transversalmente e obliquamente (seta), com presença de fibrócitos e (B) áreas de fibras colágenas mais delgadas (seta) com presença de fibroblastos. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE) 40x.....	79
Figura 5 –	Fotomicrografia de tecido palatino de indivíduo portador de síndrome de Apert evidenciando fraca marcação pelo PAS, 40x...	83
Figura 6 –	Fotomicrografias de tecido palatino de indivíduos portadores de síndrome de Apert. Evidência de grande quantidade de mucinas ácidas pela coloração Alcian Blue em pH 1,0 (A) e sulfatas em pH 2,5 (B) 40x.....	87
Figura 7 –	Fotomicrografia de mucosa de palato de indivíduo portador de síndrome de Apert (A) e indivíduo normal (B) evidenciando a diferença na marcação de GAGs no pH 2,5, 10x.....	89

Figura 8 –	Fotomicrografias de tecido palatino pela coloração Alcian Blue (pH 2,5). (A) Controle em tecido glandular normal; seta indica coloração de intensidade forte 10x; (B) indivíduo portador de síndrome de Apert com intensidade forte e (C) tecido conjuntivo normal com intensidade fraca, 40x.....	91
Figura 9 –	Fotomicrografia de um mesmo indivíduo, portador de síndrome de Apert, pela técnica do Picrossírius-confocal. Observa-se a presença de fibras espessas em diversas direções, ocupando uma grande área do tecido conjuntivo (A) e áreas de fibras mais delgadas (B), 40x.....	95
Figura 10 –	Fotomicrografia de indivíduo normal, pela técnica do Picrossírius-confocal. Observa-se a presença de fibras espessas (A) e áreas de fibras mais finas (B), 40x.....	97
Figura 11 –	Distribuição das medidas do colágeno por área nos pacientes portadores de síndrome de Apert.....	99
Figura 12 –	Comparação da área ocupada pelo colágeno nos indivíduos controle e nos pacientes portadores de síndrome de Apert.....	99
Figura 13 –	Correlação da área ocupada pelo colágeno com a idade dos pacientes portadores de síndrome de Apert.....	100
Figura 14 –	Fotomicrografia de tecido palatino de indivíduos portadores de síndrome de Apert, imunolocalização para P63 nas regiões basal e parabasal do epitélio da mucosa, 40x.....	101
Figura 15 –	Fotomicrografia de mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert e imunomarcção para colágeno I (A), colágeno III (B) e decorina (C).....	105
Figura 16 –	Fotomicrografia de mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert, com imunomarcção para colágeno I, evidenciando diferentes graus de intensidade, 40x.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Especificidade de ligantes com as isoformas de FGFRs.....	47
Tabela 2 –	Médias dos resultados dos componentes do tecido conjuntivo da mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert e do grupo controle.....	81
Tabela 3 –	Resultado das marcações para colágeno I e III; e decorina em indivíduos portadores de síndrome de Apert.....	109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	35
2	REVISÃO DE LITERATURA	39
2.1	MUCOSA ORAL	41
2.1.1	O Epitélio	41
2.1.2	O tecido conjuntivo	42
2.2	A SÍNDROME DE APERT	48
2.2.1	Epidemiologia	48
2.2.2	Aspectos clínicos	50
2.2.3	Genética molecular	55
3	PROPOSIÇÃO	59
3.1	OBJETIVO GERAL	61
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1	SUJEITOS DA PESQUISA	65
4.2	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	66
4.3	PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO	67
4.3.1	PAS (Periodic Acid-Schiff)	67
4.3.2	Alcian Blue	68
4.3.3	Picrossírius	68
4.4	PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO	69
4.5	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	71
4.5.1	Análise morfométrica	71
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
5	RESULTADOS	73
5.1	ASPECTOS HISTOLÓGICOS	75
5.1.1	Controle	75
5.1.2	Apert	75
5.2	ASPECTOS MORFOMÉTRICOS	81

5.3	ASPECTOS HISTOQUÍMICOS.....	82
5.3.1	PAS	82
5.3.2	Alcian Blue.....	85
5.3.3	Picrossírius.....	93
5.4	ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	100
5.4.1	P63.....	100
5.4.2	Colágeno I.....	103
5.4.3	Colágeno III.....	103
5.4.4	Decorina.....	103
6	DISCUSSÃO	111
7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS.....	125
	ANEXO	139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Descrita pela primeira vez em 1906 pelo médico francês Eugene Apert, a síndrome de Apert é uma condição autossômica dominante caracterizada primariamente por craniosinostose, hipoplasia do terço médio da face, e sindactilia das mãos e pés com ligeira tendência a fusão das estruturas ósseas. A prevalência é de 1 caso a cada 160.000 nascimentos (BLANK, 1960 apud SMITH, 1985) representando 4,5% dos casos de craniosinostose (COHEN et al., 1992). A maioria dos casos é esporádica, e ocorrem devido a mutações no gene do FGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento fibroblástico). (COHEN et al., 1992).

Diversas anomalias estruturais têm sido associadas à síndrome de Apert, dentre as quais se destacam as anomalias do sistema nervoso central, cardiovasculares, genitourinárias, cutâneas e orais (COHEN et al., 1992, KREIBORG; COHEN 1992). As manifestações orais mais comuns incluem palato em arco Bizantino, hiperplasia da mucosa palatina, fissura de palato mole, úvula bífida, agenesia e apinhamento dental (KREIBORG e COHEN, 1992; DALBEN et al., 2006; LETRA et al., 2007). Apesar de ser um achado freqüente na maioria dos casos de síndrome de Apert, a etiologia da hiperplasia da mucosa palatina permanece desconhecida. Apenas Solomon et al., 1973 relataram sobre as alterações histológicas nestes quadros de hiperplasia, descrevendo um acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos no tecido conjuntivo da mucosa.

Uma hipótese para a causa da hiperplasia da mucosa palatina na síndrome de Apert estaria relacionada à interação de componentes da matriz extracelular conjuntiva com a via de sinalização FGF/FGFR. Os FGFs (Fatores de Crescimento Fibroblástico) são uma família de ligantes polipeptídicos, que atuam por sinalização parácrina e autócrina, com amplo espectro de ação durante a vida embrionária, fetal e adulta (COULIER et al., 1997), e cuja ação requer interação com seu receptor (Receptor do Fator de Crescimento Fibroblástico – FGFR) e uma proteoglicana. Tal interação acarreta a dimerização do FGFR seguida da ativação da atividade tirosina-quinase, que por sua vez irá mediar a função celular (WEBSTER et al., 1997). Os FGFRs são receptores transmembrana da classe das tirosina-quinase (GIVOL; YAYON, 1992) pertencentes a uma família de quatro receptores (FGFR1-4)

(JHONSON et al., 1993). Ambos, FGFs e FGFRs, regulam uma diversidade de processos celulares, tais como crescimento, diferenciação, migração e sobrevivência celular (JANG et al., 2001). O controle rigoroso dos mecanismos envolvidos na proliferação e função celular é um dos princípios fundamentais ao estado de equilíbrio orgânico e a via de sinalização do FGFR está envolvida em uma série de processos fisiológicos e patológicos críticos (McINTOSHI et al., 2000).

Devido às implicações clínicas da hiperplasia da mucosa palatina nos pacientes da síndrome de Apert e a ausência de literatura a respeito, o objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia e morfometria do tecido conjuntivo da mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert, avaliando a proporção dos constituintes teciduais e componentes da MEC (matriz extracelular) relacionados à via de sinalização FGF/FGFR e a organização das fibras de colágeno, no sentido de caracterizar as alterações teciduais na mucosa oral destes pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para um melhor entendimento das alterações teciduais orais em pacientes portadores da síndrome de Apert, apresentamos uma breve revisão dos aspectos macroscópicos e microscópicos da mucosa oral normal.

2.1 MUCOSA ORAL

2.1.1 Epitélio

A cavidade oral apresenta-se recoberta por uma túnica contínua de mucosa espessa, cujo papel fundamental é proteger as estruturas orais de agentes presumivelmente agressivos que entram na boca (DOUGLAS, 1998). Essa mucosa é composta por um epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado ou não, sobreposto à lâmina própria constituída por um conjuntivo fibroso denso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008a). O epitélio pavimentoso não queratinizado reveste o palato mole, lábios, bochechas e o assoalho da boca e seu conjuntivo adjacente possui papilas similares àquelas observadas na derme. É contínuo com a submucosa, que contém glândulas salivares menores distribuídas difusamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008a; NINCI, 2008; SHKLAR, 1983). O epitélio é formado por quatro estratos: germinativo, espinhoso, granuloso e córneo. O estrato córneo pode ser observado na gengiva e palato duro, sendo que nestas regiões a mucosa é denominada mucosa mastigatória, por ser submetida a maiores forças mecânicas, principalmente durante a mastigação. No estrato córneo as células não apresentam uma estrutura definida, são mais apagadas e difusas, devido à perda de individualidade citológica por alterações da membrana plasmática. O estrato granuloso é composto por células que tendem a achatar-se e, neste ponto, começa a infiltração citoplasmática com grânulos de querato-hialina. Há uma redução no volume de cada célula, que se torna mais estreita. O estrato espinhoso é denominado assim pelas formas irregulares das células epiteliais, que emitem

processos celulares para dentro dos estreitos espaços intercelulares contendo uma substância amorfa, formada por glicosaminoglicanas, particularmente o sulfato de condroitina. Esta substância seria originada no tecido conjuntivo subjacente. O estrato germinativo é o mais interno e possui grande capacidade proliferativa, onde é possível a detecção de mitoses; contudo possui células pouco diferenciadas. O epitélio da mucosa oral forma uma zona relativamente ampla de membrana basal, logo após as zonas papilar e reticular da lâmina própria (DOUGLAS, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008a; Nanci, 2008).

Sugere-se que o epitélio da mucosa oral e o tecido conjuntivo (mesênquima) subjacente interagem reciprocamente através de moléculas sinalizadoras. Assim essas interações seriam permissivas ou diretivas, no sentido de favorecer o desenvolvimento do epitélio numa determinada direção, até adotar as características de sua morfofisiologia adulta. Isto determinaria as propriedades peculiares de cada tipo de mucosa e favoreceria o mecanismo de renovação e regeneração da mucosa (DOUGLAS, 1998).

2.1.2 O Tecido conjuntivo

O tecido conjuntivo da mucosa oral está estruturalmente constituído por uma população heterogênea de células e uma abundante matriz extracelular (MEC). As células estão representadas pelos fibroblastos (responsáveis pela fibrinogênese e formação da substância fundamental), macrófagos, mastócitos, plasmócitos e leucócitos. Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Estas células também estão envolvidas na produção de vários fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de moldar sua capacidade metabólica, a qual vai se refletir na sua morfologia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008b).

No tecido conjuntivo normal, os fibroblastos residem em um estado quiescente tendo uma taxa de proliferação e atividade metabólica baixas. Quando o

tecido é lesado, os fibroblastos tornam-se ativos e mudam seu padrão de expressão gênica. Fibroblastos quiescentes apresentam uma mudança rápida na expressão de centenas de genes quando estimulados pelo contato com o plasma. Curiosamente, muitos dos genes ativados pelo contato com o plasma estão envolvidos na fisiologia da reparação de feridas, como os de controle do ciclo celular e proliferação, coagulação e hemostasia, inflamação, angiogênese, remodelação tecidual, reorganização do citoesqueleto e reepitelização (YER et al., 1999).

Os fibroblastos gengivais possuem algumas diferenças funcionais em relação aos fibroblastos localizados em outras regiões. Muitos estudos têm comparado as propriedades dos fibroblastos da pele e da gengiva de adultos com fibroblastos fetais. Os relatos indicam que os fibroblastos gengivais de adultos localizados na região papilar da lâmina própria compartilham muitas propriedades com os fibroblastos fetais, incluindo suas propriedades de crescimento e migração, morfologia celular, produção de fatores estimuladores da migração e produção e resposta às citocinas. Os fibroblastos da pele não mostraram essa semelhança (SCHOR et al., 1996). Os fibroblastos gengivais também diferem dos fibroblastos da derme na sua capacidade de secretar enzimas proteolíticas. A metaloproteinase 13, uma potente collagenase, é expressa no tecido de granulação da gengiva entre os dias 7 e 14 de reparo da ferida, o que não ocorre na lesão de pele (RAVANTI et al., 1999). Fato importante a salientar é que, durante o reparo de uma ferida, diversas moléculas que são expressas apenas durante o desenvolvimento embrionário são encontradas no tecido de granulação. É possível que os fibroblastos gengivais sejam fenotipicamente únicos no tecido adulto e possam contribuir para o rápido reparo de lesões orais com mínima reação cicatricial (HÄKKINEN et al., 2000).

Única também é a constituição do tecido conjuntivo. Diferente de outros tipos de tecidos, o principal constituinte do tecido conjuntivo é a matriz extracelular (MEC), composta por diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substância fundamental. As proteínas fibrosas são representadas pelo colágeno que se estruturam extracelularmente em fibrilas e estas em fibras colágenas. As fibrilas longas de colágeno são formadas pela agregação de moléculas de colágeno I, II, III, V e IX, sendo que as fibrilas de colágeno tipo III são finas e pouco birrefringentes e freqüentemente estão associadas às fibrilas de colágeno tipo I, as mais abundantes e espessas, e altamente birrefringentes. Os colágenos tipo IX e XII são estruturas

curtas que unem as fibrilas de colágeno entre si, enquanto que o colágeno tipo IV forma uma rede, com importante papel de aderência e filtração nas lâminas basais. O colágeno VII está presente nas fibrilas que ancoram as fibras de colágeno à lâmina basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008b).

A substância fundamental é um complexo viscoso e altamente hidrofílico composto por glicosaminoglicanas (GAGs), proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que se ligam às proteínas receptoras presentes na superfície da célula bem como a outros componentes da matriz, fornecendo desse modo força tênsil e rigidez à matriz extracelular. As glicosaminoglicanas são polímeros lineares formados por unidades repetidas dissacarídicas usualmente compostas de ácido urônico e de uma hexosamina. Com exceção do ácido hialurônico, todas as outras glicosaminoglicanas têm algum grau de sulfatação e estão ligadas covalentemente a um eixo protéico, formando a molécula de proteoglicana (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008b). A decorina, que faz parte da pequena família de proteoglicanas ricas em leucina (IOZZO, 1999), é uma das proteoglicanas relacionados à fibrillogênese do colágeno mais bem estabelecidas na literatura (CORRÊA et al., 2005). Ao se ligar à superfície de fibrilas colágenas através de sua cadeia protéica, a decorina afeta a taxa de formação fibrilar (SCOTT; HAIGH, 1988; REED; IOZZO, 2002) e determina um espaçamento regular ao agrupamento das fibrilas em bandas (DANIELSON et al., 1997; KUWABA et al., 2002). Zhang et al (2007) observaram que a decorina inibe a secreção de colágeno tipo I em cultura de fibroblasto obtidos de região de cicatriz hipertrófica, o que não ocorreu em relação ao colágeno tipo III. A decorina também está relacionada com o crescimento celular (MOSCATELLO et al., 1998) e participa de muitos processos de sinalização intra e extracelulares, incluindo a ligação e inibição do fator transformador do crescimento- β (TGF- β), mesmo quando ligada ao colágeno (KRESSE; SCHONHERR, 2001). A função da decorina na regulação do TGF- β , formando complexos inativos, sugere a participação desta molécula em processos fibróticos/escleróticos (YAMAGUCHI et al, 1990; FERDOUS et al., 2007). Hakkinen et al, (2000) demonstraram que o ligamento periodontal de ratos deficientes em decorina apresenta uma densidade de fibroblastos duas vezes maior que em ratos normais e concluíram que a decorina ligada ao TGF- β , ou ao fator de crescimento epidermal (EGF), inibe a proliferação celular. A degradação da

decorina pelas metaloproteinases da matriz, como ocorre no processo de reparação tecidual, libera o TGF- β (AL HAJ ZEN et al., 2003).

O TGF- β é um regulador celular essencial expresso durante o desenvolvimento, proliferação celular e deposição da matriz extracelular (MASSAGUÉ, 1998). É um potente ativador de fibroblastos estimulando sua proliferação (LEOF et al., 1986) e aumentando a expressão gênica de diversas proteínas matriciais, sendo fundamental para o aumento na formação e deposição da MEC (ROBERTS, 2002). Também regula a expressão do pró-colágeno tipo I, efeito que é acompanhado do aumento na síntese da biglicana e versicana, duas proteoglicanas da matriz que contêm sulfato de condroitina. No entanto, a ação desse fator de crescimento sobre a decorina é inibitória (KÄHÄRI et al., 1991). Três isoformas do TGF- β foram identificadas em mamíferos (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) e podem estar relacionados à formação de cicatriz hipertrófica. A reparação tecidual resulta de uma interação coordenada das três isoformas de TGF- β . O TGF- β 1 e o TGF- β 2 parecem causar aumento de fibrose tecidual, enquanto que o TGF- β 3 exerce um efeito regulatório sobre os anteriores (ZHANG et al, 2007). O TGF- β 1 promove o aumento da produção de colágeno, aumento da expressão de integrinas e diminuição da expressão de inibidores das metaloproteinases durante a reparação tecidual (LIU et al., 2004).

Outros fatores de crescimento são fundamentais para o equilíbrio tecidual. Dentre eles, o fator de crescimento fibroblástico que está envolvido em uma série de eventos celulares. Os FGFs são uma família de ligantes polipeptídicos, com amplo espectro de ação durante a vida embrionária, fetal e adulta (COULIER et al., 1997). Pelo menos 22 FGFs são conhecidos (BRITO et al., 2001) e são potentes estimuladores mitogênicos de queratinócitos epidermais, de fibroblastos da derme e de células endoteliais, os quais são elementos chave nos processos de reepitelização de ferimentos, formação de tecido de granulação e angiogênese, respectivamente (McINTOSH et al., 2000). A biologia do FGF é bastante complexa, envolvendo múltiplos ligantes, receptores e co-fatores, cada um expresso em diferentes padrões de espaço e tempo; e em cinética distinta no curso do desenvolvimento normal (WILKIE et al., 1995a). O sinal biológico para a ação do FGF é ativado por uma interação tripla entre o FGF, seu receptor (receptor do fator de crescimento fibroblástico- FGFR) e uma proteoglicana, que causa a dimerização

do FGFR seguida da ativação da atividade tirosina-quinase. Este último produto irá mediar a função celular (WEBSTER e DONOGHUE, 1997). Os primeiros FGFs identificados foram o FGF-1, também denominado FGF ácido (FGFa) e o FGF-2, ou FGF básico (FGFb) (OSTROVSKY et al., 2002). Este último pode ser encontrado tanto na matriz extracelular quanto na membrana basal.

As glicosaminoglicanas são necessárias para a sinalização do FGF/FGFR e animais com deficiência na biossíntese de GAGs apresentam perda completa da sinalização do FGF com o FGFR (ORNITZ, 2000). Os dois principais tipos de GAGs, relacionados ao FGF/FGFR, são o sulfato de heparana (HS) (DOWD et al., 1999) e o sulfato de condroitina (CS). Ambos são cadeias de GAGs altamente sulfatadas expressas na superfície da célula e na matriz extracelular na forma de HS, CS ou formas híbridas de HS/CS. A interação entre FGF/FGFR/GAGs depende em grande parte de seqüências específicas nas moléculas de GAGs. Essa interação pode ativar ou inibir as vias de sinalização mediadas pela ligação do FGF e seu receptor FGFR, ou ainda não ter nenhum efeito sobre esta sinalização (TROWBRIDGE et al., 2002).

Os FGFs também apresentam grande afinidade pela heparina, um polissacarídeo altamente sulfatado, que apresenta similaridade estrutural com o sulfato de heparana (LINDHAL et al., 1998). As GAGs são co-fatores obrigatórios para a ligação do FGF ao receptor e sua dimerização e constituem um mecanismo para a regulação da interação do FGF com o FGFR (YAYON et al., 1991). A ligação do FGF com a heparina ou com a HSPG (proteoglicana de heparam sulfato) ainda confere proteção contra a desnaturação, além de impedir a ação de proteases (NUGENT; IOZZO, 2000).

As respostas celulares aos FGFs são mediadas pela ligação com os FGFRs, receptores da classe tirosina-quinase, que estão presentes na superfície celular (GIVOL; YAYON, 1992). Os FGFRs pertencem a uma família de quatro receptores (FGFR1-4) que apresentam três domínios extracelulares similares à imunoglobulina (Ig-like) denominados D1, D2 e D3, um domínio na porção transmembrana, e dois domínios intracelulares (JOHNSON et al., 1993). Como outros receptores tirosina-quinase, a dimerização do FGFR é uma etapa fundamental na ativação do receptor e sinalização intracelular e existem muitos níveis de regulação para controlar sua ativação. Uma importante característica da família FGFR é quanto à diversidade de isoformas geradas por sítios de ligação alternativos, como os sítios de ligação

alternativos do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) dos FGFR1-3, que originam duas isoformas “b” e “c” (Figura 1), que se ligam a distintos subgrupos de FGFs (DELL; WILLIAMS, 1992). Por exemplo, enquanto a isoforma FGFR2b se liga ao FGF7 e FGF10, mas não ao FGF2; o FGFR2c liga-se ao FGF2 e FGF18, mas não ao FGF7 e FGF10. A Tabela 1 resume a especificidade de cada uma das isoformas para diferentes FGFs. Orr-Urtreger et al. (1993), demonstraram que a isoforma FGFR2b é exclusivamente expressa em células epiteliais e que o FGFR2c é expresso exclusivamente em células mesenquimais, sendo assim, a expressão de linhagens específicas das isoformas “b” e “c” dos FGFRs possibilita a interação entre as camadas mesenquimal e epitelial durante o desenvolvimento em resposta a diferentes FGFs (ESWARAKUMAR et al., 2005).

Eswarakumar et al., 2005

Figura 1 – Estrutura do FGFR e as isoformas de FGFR geradas por sítios de ligação alternativos

Tabela 1 – Especificidade de ligantes com as isoformas de FGFRs

ISOFORMA DE FGFR	LIGANTE ESPECÍFICO
FGFR1b	FGF1, -2, -3 e -10
FGFR1c	FGF1, -2, -4, -5 e -6
FGFR2b	FGF1, -3, -7, -10, e -22
FGFR2c	FGF1, -2, -4, -6, -9, -17 e -18
FGFR3b	FGF1 e 9
FGFR3c	FGF1, -2, -4, -8, -9, -17, -18 e -23
FGFR4	FGF1, -2, -4, -6, -8, -9, -16, -17, -18, -19

Eswarakumar et al., 2005

Ambos, FGFs e FGFRs, regulam uma diversidade de processos celulares, tais como crescimento, diferenciação, migração e sobrevivência celular (JANG et al., 2001). O controle rigoroso dos mecanismos envolvidos na proliferação e função celular é um dos princípios fundamentais ao estado de equilíbrio orgânico e a via de sinalização do FGFR está envolvida em uma série de processos fisiológicos e patológicos críticos (McINTOSH et al., 2000). As respostas celulares aos FGFs dependem tanto dos tipos de receptores expressos, como também das proteínas citoplasmáticas mobilizadas após a estimulação (SILVA, 2006).

Mutações nos FGFRs são descritas na literatura como causa de desequilíbrio na proliferação e produção celular envolvendo tecidos dos diversos sistemas orgânicos e pode estar associada a neoplasias ou síndromes. A hiperplasia da mucosa oral é citada como uma das consequências dessas mutações quando associadas às síndromes (SHKLAR, 1983). Mutações nos FGFRs têm sido descritas como causa de diversas síndromes como as de Apert, Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss, Antley-Bixler e Beare-Stevenson (IBRAHIMI et al., 2001) e a hiperplasia da mucosa de palato duro tem sido descrita como freqüente na síndrome de Apert (DALBEN et al., 2006; LETRA et al., 2007).

Carinci et al., 2007 concluíram que efeitos cooperativos entre a MEC e os fatores de crescimento regulam a produção regional de matriz durante os eventos morfogênicos, durante a remodelação de tecido conjuntivo e em estados patológicos.

2.2 A SÍNDROME DE APERT

2.2.1 Epidemiologia

A síndrome de Apert é caracterizada por craniosinostose e sindactilia simétrica de mãos e pés e corresponde a 4,5% de todos os casos de craniosinostose (COHEN et al., 1992).

Os dois primeiros casos da síndrome foram descritos por Wheaton em 1894, entretanto o autor atribuiu o fenótipo da cabeça e os problemas respiratórios à sífilis e relatou que a causa da sindactilia seria a inflamação fetal associada à compressão intra-uterina (CUNNINGHAM et al., 2007). Duas décadas após esse relato, o pediatra francês, Dr. Eugene Charles Apert (1868-1940) descreveu nove casos de sindactilia associada à acrocefalia (APERT, 1960 apud CUNNINGHAM et al., 2007), caracterizando a síndrome que levou o seu nome.

Devido à raridade da doença, poucos estudos abordaram uma população grande o suficiente para permitir a avaliação das características epidemiológicas da síndrome de Apert (TOLAROVA et al., 1997). Entre eles está o trabalho de Cohen et al. (1992), realizado entre os anos de 1958 e 1989. Os autores relataram que estudos anteriores sobre a prevalência da doença eram baseados em poucos casos e não refletiam a realidade. Foram então incluídas neste estudo sete áreas geográficas: Dinamarca, Itália, Espanha e Estados Unidos. Neste último, foram coletados os dados da região norte da Califórnia, dos estados de Nebraska e Whashington e da cidade de Atlanta. O número total de nascidos vivos incluídos no trabalho foi de 3.686.592, sendo 57, portadores da síndrome de Apert. Para a confirmação do número de nascidos afetados pela síndrome de Apert em cada região, foram examinados os prontuários hospitalares e o diagnóstico foi confirmado com base na descrição clínica da doença, radiografias, fotografias dos indivíduos e laudos específicos fornecidos por um geneticista. A prevalência de nascimentos de portadores da síndrome de Apert, nas sete populações estudadas, foi estimada em 15,46 por milhão de nascidos vivos, com uma taxa de mutação estimada em $7,73 \times 10^{-6}$ por gene por geração.

Em um outro estudo, realizado entre os anos de 1980 e 1989 na Hungria, a prevalência da síndrome de Apert foi de 9,93 por milhão, em uma amostra de 1.309.583 de nascidos vivos e 13 portadores da síndrome. A estimativa da taxa de mutação foi de $4,96 \times 10^{-5}$ por gene por geração (CZEIZEL et al., 1993).

Tolarova et al. (1997) estudaram a prevalência da síndrome de Apert na Califórnia em 2.493.331 de nascidos vivos, entre os anos de 1983 e 1993, identificando 31 portadores da síndrome. O resultado foi uma prevalência de 12,43 por milhão de nascidos vivos e a taxa de mutação calculada por gene por geração foi de $6,22 \times 10^{-6}$. A população multirracial da Califórnia ainda proporcionou aos

mesmos autores a oportunidade de avaliarem a prevalência da síndrome de Apert entre as diferentes etnias. A maior prevalência foi observada entre populações de origem asiática, com 22,3 por milhão de nascidos vivos e a menor entre populações de origem hispânica com 7,6 por milhão. Entre os caucasianos, que constituíram a maioria da amostra, a prevalência de nascimentos com a síndrome de Apert foi de 16,6 por milhão de nascidos vivos e não foi observada neste estudo a ocorrência da síndrome em populações com descendência africana.

Na Espanha, a prevalência da síndrome de Apert, para os anos de 1976 a 1988, foi de 17 casos em uma amostra de 1.502.639 nascidos vivos, resultando em uma prevalência de 11 por milhão de nascidos vivos (ARROYO-CARRERA et al., 1999).

Em relação à distribuição por sexo, Tolarova et al. (1997) analisaram duas amostras populacionais afetadas pela síndrome de Apert. A primeira amostra foi proveniente do Programa de Monitoramento de Defeitos ao Nascimento da Califórnia (CBDMP), onde praticamente a mesma proporção entre homens e mulheres foi afetada pela síndrome de Apert, com uma proporção de 0,94. A segunda amostra consistiu de crianças tratadas no Centro de Anomalias Craniofaciais da Universidade da Califórnia e apresentou uma proporção de 0,7. Quando os autores analisaram as duas amostras em conjunto, observaram que a maior proporção de mulheres na segunda amostra afetou a proporção, que foi de 1:1,3 ou 0,77. Cohen e Krieborg (1990) relataram não haver diferença da severidade da síndrome entre os sexos.

Apesar de o envolvimento de mais de um indivíduo com síndrome de Apert em mesma família (CZEIZEL et al., 1993), o risco de recorrência da síndrome de Apert para pais normais é desprezível, enquanto que o risco de recorrência para filhos de indivíduos afetados é de 50% (GONZÁLES et al., 1986).

2.2.2 Aspectos clínicos

As manifestações fenotípicas incluem sindactilia simétrica digital de mãos e pés, com fusão cutânea e óssea e crânio encurtado em seu diâmetro antero-

posterior e alongado verticalmente, gerando o aspectoacrocefálico característico (BLANK, 1960, “apud” SMITH, 1985). A maxila é frequentemente hipoplásica e a mandíbula proeminente, resultando em um prognatismo moderado. As órbitas são rasas e oblíquas lateralmente, com hipertelorismo, buftalmia e geralmente estrabismo. O nariz é curto e alargado e as orelhas apresentam baixa implantação. As alterações sistêmicas mais comuns são as cardiovasculares e genitourinárias além da perda progressiva da visão e da audição (COHEN et al., 1992).

A deformidade craniana está quase sempre associada à fusão prematura das suturas coronárias, embora a base do crânio também esteja envolvida (GEIST; DIAZ, 1982). Gonçalves et al. (1985) não consideram o fechamento precoce das suturas como mecanismo patogênico, e sim uma displasia frontal que origina uma hipoplasia dos ossos da fossa anterior craniana, com diminuição do desnível existente entre os compartimentos cranianos. Outros autores, entretanto, caracterizam a síndrome pelo fechamento precoce das suturas coronárias (BLANK, 1960 apud SIMTH, 1985; COHEN; KEIBORG, 1994; AVANTAGGIATO et al., 1996). A avaliação da síndrome de Apert por meio da tomografia computadorizada tridimensional (TC-3D), realizada por Albuquerque e Cavalcanti (2004) mostrou sinostose coronária simétrica bilateral, condição esta que levaria à alteração da forma do crânio, como a braquicefalia. Estes resultados são condizentes com os achados de Kreiborg et al. (1993), que utilizaram a TD-3D na avaliação do crânio de indivíduos portadores de síndrome de Apert e observaram a fusão prematura das suturas coronarianas, apesar de desencorajarem a utilização do termo “craniosinostose”, devido à ausência de uma formação interdigital, propriamente dita, na região coronal. Alterações no processo de ossificação durante o desenvolvimento embrionário e alterações no fenótipo de fibroblastos e osteoblastos presentes no sítio articular podem levar ao dismorfismo cranial e facial típicos da síndrome de Apert (BODO et al., 1997). A clássica redução da distância antero-posterior (braquicefalia), com pseudoexoftalmo pela hipoplasia orbital; o hipotelorismo; a fronte proeminente; a fissura palpebral com obliquidade para baixo (do tipo mongolóide); o nariz pequeno com discreta hipoplasia das asas nasais e a importante hipoplasia maxilar, são sinais que revelam o dismorfismo crânio-facial na síndrome de Apert (MUSTACCHI; PERES, 2000).

A condrogênese anormal das suturas cranianas foi demonstrada por Wang et al. (2005) utilizando ratos “knock-in” para a mutação da síndrome de Apert. A análise da sutura sagital dos ratos mutantes propõe duas possibilidades, um aumento significativo na proliferação da cartilagem nas junções dos ossos parietal e interparietal, ou a formação de cartilagem ectópica a partir de células progenitoras. Observaram também um aumento de cartilagem na base do crânio, osso nasal, traquéia e ossos longos. A diferenciação osteoblástica anormal também foi relatada pelos autores, que observaram que o desenvolvimento ósseo na síndrome de Apert pode variar de acordo com suturas específicas e que uma sinostose pode ocorrer tanto pelo aumento do crescimento, pela proliferação e diferenciação, como pelo aumento da apoptose na sutura.

Em 1960, Blank classificou a síndrome em duas categorias clínicas: pacientes com a acrocefalosindactilia típica, na qual o nome síndrome de Apert era apropriado (Tipo 1) e pacientes com outras formas que correspondiam a quadros atípicos e fenotipicamente diferentes (Tipo 2). A maneira para distinguir os dois tipos era pela forma da mão, onde, na síndrome de Apert há a união dos dígitos 2-4, com uma única unha, e nas outras formas a fusão assume um formato de leque (BLANK, 1960 apud SMITH, 1985). Dessa maneira, a massa mediodigital no lugar da mão, consiste numa sindactilia dos tecidos ósseos do segundo, terceiro e quarto dedos; e, em alguns casos, ocorre fusão do primeiro com o quinto, e do segundo com o quarto dedos. As unhas dos dedos são contínuas, ou parcialmente contínuas, com alguma segmentação; os dedos podem ser curtos, havendo sindactilia cutânea de todos os dedos, com ou sem sindactilia óssea; a extremidade do polegar muitas vezes é grossa e mal formada (SMITH, 1985). Nos pés, o segundo, terceiro e quarto artelhos são unidos por tecido mole. O primeiro e o quinto artelhos podem estar livres ou unidos e as unhas, geralmente são separadas (BROXADO et al., 1999). A severidade da sindactilia e o padrão de transmissão genética distinguem a síndrome de Apert de outras acrocefalosindactilias como síndrome de Chotzen, síndrome de Waardenburg, síndrome de Pfeiffer, síndrome de Summit e síndrome de Carpenter (GONÇALVES et al., 1985; GEIST; DIAZ, 1982).

Diversas anomalias estruturais e sistêmicas podem também compor o quadro sindrômico, dentre estas, alterações no sistema nervoso central, anomalias viscerais e orais. As alterações no sistema nervoso central incluem hipoplasia ou agenesia do

corpo caloso (QUINTERO-RIVERA et al., 2006), ventriculomegalia, hipoplasia do septo pelúcido, cisto de aracnóide (YACUBIAN-FERNANDES et al., 2005). Variados graus de deficiência mental são associados com a síndrome de Apert, entretanto tem sido relatado que indivíduos afetados também podem apresentar inteligência normal. Patton et al (1988) em um estudo com 29 pacientes com síndrome de Apert mostraram que 14 (48%) tinham QI normal ou próximo do normal, 9 tinham atraso mental discreto (QI 50-70), 4 apresentavam grau de atraso moderado (QI 35-49) e 2 (7%) um grau severo de atraso mental (QI menor que 35).

Dentre as anomalias viscerais, Cohen e Kreiborg (1993) observaram em sua amostra de 136 pacientes com síndrome de Apert, anomalias nos sistemas cardiovascular e genitourinário, ocorrendo em 10% e 9,6% dos casos, respectivamente. Dentre as alterações observadas no sistema genitourinário, a hidronefrose (3%) e o criptorquidismo (4,5%, n= 66 homens) ocorreram mais comumente. Em contraste, as anomalias do sistema respiratório (1,5%) e as anomalias gastrointestinais (1,5%) ocorreram com menor frequência. Manifestações cutâneas também são observadas e as mais comuns são a hiperhidrose, hipopigmentação, hiperqueratose e acne severa (COHEN; KREIBORG, 1995; VERMA; DRAZNIN, 2005; DeGIOVANNI et al., 2007).

Manifestações orais na síndrome de Apert também foram descritas por diversos autores (SOLOMON et al., 1973; PETERSON; PRUZANSKI, 1974; KREIBORG; COHEN, 1992; DALBEN et al., 2006; LETRA et al., 2007). Solomon et al. (1973) descreveram a mucosa palatina em indivíduos portadores de síndrome de Apert apresentando um aumento volumétrico lateral e observaram ser um fenômeno idade-dependente. A análise histológica da mucosa palatina destes indivíduos mostrou um depósito de mucopolissacarídeos ácidos sulfatados em seis dos sete pacientes com a síndrome, e em apenas três de quinze indivíduos controle. Apesar desses autores não concluírem sobre o real significado do excesso de mucopolissacarídeos no palato de pacientes com síndrome de Apert, sugeriram um distúrbio na incorporação normal dessas substâncias nos estágios finais do desenvolvimento da matriz óssea e lançaram o desafio para novos estudos. Trabalhos posteriores mostraram através de avaliação tomográfica, que esse aumento volumétrico da mucosa palatina era constituído principalmente por tecido mole (ALBUQUERQUE; CAVALCANTI, 2004).

Kreiborg e Cohen (1992) avaliaram 119 indivíduos portadores da síndrome e relataram que os pacientes apresentavam boca em forma trapezoidal com os lábios separados, indicativos de respiração bucal. Além disso, os pacientes apresentavam o palato em forma de arco Bizantino, e também aumento volumétrico lateral da mucosa palatina. Corroborando os achados de Solomon et al. (1973), esse fenômeno tornou-se mais evidente com o avançar da idade e produziu um aspecto de pseudo-fissura nos casos mais severos. A fissura de palato mole foi observada em 41% dos pacientes e em nenhum caso a fissura se estendeu à porção anterior do palato duro; outros 35% tinham úvula bífida. As anormalidades de palato, em combinação com as características craniais e orais, podem afetar a respiração e a fala; e indiretamente, também podem contribuir para o fenótipo facial típico da síndrome de Apert (PETERSON; PRUZANSKY, 1974).

Com relação ao desenvolvimento dentário em pacientes com síndrome de Apert destacam-se o severo atraso na erupção dentária (68%), erupção ectópica (50%), problemas de oclusão e apinhamento dentário (KREIBORG; COHEN, 1992). Dalben et al. (2006) avaliaram nove pacientes com síndrome de Apert dos quais 44% apresentaram agenesia dentária, sendo 50% do canino superior, 25% dos incisivos laterais superiores e 12,5% do canino inferior e segundo pré-molar inferior. Os autores também relataram a presença de aumento volumétrico da mucosa palatina em 88% dos casos, sendo esta a alteração mais comum do estudo. Letra et al. (2007) relataram que dos 23 casos de síndrome de Apert avaliados em seu estudo, 91% apresentaram um aumento de volume da mucosa palatina. Outras observações importantes e correlatas foram a presença de boca em formato trapezoidal (82%), lábios hipotônicos (74%), maxila atrófica (70%), palato em arco bizantino (70%), agenesia dentária (41%) e problemas oclusais devido ao apinhamento dentário. Entretanto, em contraste a estudos anteriores onde a presença de fissura palatina foi observada em 40% dos pacientes, Letra et al. (2007) observaram apenas 1 caso (4%) de fissura palatina em sua amostra.

Recentemente, a remoção cirúrgica deste aumento volumétrico da mucosa palatina foi proposta para indivíduos com síndrome de Apert com a finalidade de aumentar o tamanho da coroa clínica dos dentes para aplicação das bandas e acessórios ortodônticos. Entretanto, observou-se um aumento tecidual rápido e

exuberante nos meses seguintes ao procedimento cirúrgico, sendo o resultado final pior que o inicial*.

A saúde oral dos pacientes portadores de síndromes associadas à craniosinostose foi avaliada por Mustafá et al. (2001), comparando crianças normais a um grupo de 57 crianças com idade entre 3 e 16 anos, portadores das síndromes de Apert, Crouzon, Pfeifer e Saethre-Chotzen. Seus resultados revelaram maior frequência de cáries e maior quantidade de placa nos indivíduos portadores das síndromes estudadas, quando comparada ao grupo controle, fato atribuído à dificuldade de escovação, sugerindo que esses pacientes devem ter um acompanhamento profissional. Múfalo et al. (2009) comparou a saúde periodontal entre indivíduos portadores das síndromes de Apert, Crouzon, Pfeifer e Saethre-Chotzen e observaram que a inflamação gengival ocorreu em todas as regiões da cavidade oral e em todas as síndromes. O índice de placa apresentou maiores valores no lado esquerdo e pacientes com síndrome de Pfeifer mostraram maior eficiência na escovação quando comparados a indivíduos com as outras síndromes abordadas neste estudo.

2.2.3 Genética molecular

A síndrome de Apert é uma condição autossômica dominante, causada por mutações ativadoras no cromossomo 10q26, gene que codifica o receptor 2 do fator de crescimento fibroblástico (FGFR2) (IBRAHIMI et al., 2004; DALBEN et al., 2006), onde ocorrem substituições específicas envolvendo os aminoácidos adjacentes Ser252Trp ou Pro253Arg (WILKIE et al., 1995b) (Figura 2). A mutação Ser252Trp, encontrada em dois terços dos pacientes com síndrome de Apert, tem sido associada a anomalias craniofaciais mais severas e a desordens dermatológicas, enquanto a mutação Pro253Arg está associada à fusão mais severa dos dedos das mãos e pés (von GERNET et al., 2000).

* Comunicação Pessoal – Profa. Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida, Periodontia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo - HRAC/USP.

Em 1995 a etiologia molecular da síndrome de Apert foi definida por Wilkie et al. (1995b). Esses autores estabeleceram que a mutação do FGFR2 na síndrome de Apert envolve a substituição de um dos dois resíduos de aminoácidos Ser252Trp ou Pro253Arg localizados na região de alça entre os domínios Ig-like II e III da molécula do FGFR2. Os autores sugerem que essas mutações alteram a orientação dos domínios Ig-like II e III da molécula de FGFR2 e/ou a conformação local do sítio de ligação e assim, simulam ou, mais provavelmente, acentuam a ligação com os FGFs. Anderson et al. (1998) também relataram que a síndrome de Apert surge como resultado de uma afinidade aumentada entre os receptores mutantes e

ligantes específicos e que há uma diminuição da cinética de dissociação do FGFR2 com os FGFs.

Estudos cristalográficos e bioquímicos dos FGFR2 mutantes (Ser252Trp e Pro253Arg) com vários FGFs indicam que a mutação resulta em aumento da afinidade e alteração da especificidade de ligação entre FGFs e o FGFR2. (YU; ORNITZ, 2001; IBRAHIMI et al., 2004). A mutação Ser252Trp manifesta um maior aumento da afinidade para a maioria dos FGFs do que a mutação Pro253Arg. Isto se correlaciona bem com o fenótipo craniofacial mais severo em pacientes com a mutação Ser252Trp (ANDERSON et al., 1998). McDowell et al. (2006) mostraram que combinações específicas de FGFs e glicosaminoglicanas (GAGs) ativam ambas as formas de FGFR2 mutantes, mas o mesmo não ocorre com formas normais de FGFR. Lomri et al., (1998) demonstraram que as mutações no FGFR2c expresso no mesênquima são responsáveis pela maioria das patologias na síndrome de Apert.

As glicosaminoglicanas são necessárias para a sinalização FGF/FGFR. Animais com deficiência na biossíntese dessas moléculas apresentam perda completa da sinalização do FGF/FGFR (ORNITZ, 2000). McDowell et al. (2006) relataram que combinações específicas de GAGs, FGFs e FGFRs determinam a intensidade da sinalização dependente do FGF e sugerem que a estrutura e a concentração de GAGs em células e tecidos, sejam importantes reguladores da atividade FGF/FGFR. Concordando com essas observações, Ibrahimi et al. (2001) observaram que o FGF7 promove sinalização no FGFR2 mutante (Ser252Trp), mas a afinidade entre o FGF7 e o FGFR2c é desprezível, provavelmente porque GAGs específicas medeiam essa interação. Isto pode explicar em parte a variedade do fenótipo em pacientes portadores de síndrome de Apert, apesar de carregarem a mesma mutação (Ser252Trp) no FGFR2.

Além disso, apenas alguns tecidos e órgãos são afetados durante o desenvolvimento e no adulto. Isto pode ser devido à disponibilidade do ligante e à modificação da atividade por cadeias específicas de GAGs (McDOWELL et al., 2006). As seqüências de GAGs não são codificadas diretamente por genes, mas são montadas no complexo de Golgi por enzimas codificadas por mais de 40 genes (ESKO; LINDAHL, 2001). Além disso, o “turnover” das GAGs na superfície celular é extremamente rápido dentro do ciclo celular (YANAGISHITA e HASCALL, 1992). Isto significa que a quantidade e a qualidade das estruturas das GAGs são passíveis de

alteração em resposta à variações de fatores ambientais. Nesse contexto, Carinci et al. (2005) relataram que a regulação dos processos de ossificação e fusão das estruturas cranianas são dependentes do microambiente extracelular.

Diversos estudos foram realizados para verificar o papel dos componentes da MEC no fenótipo da síndrome de Apert. Bodo et al. (1997) observaram que fibroblastos do periósteo de pacientes portadores de síndrome de Apert produzem, *in vitro*, grande quantidade de GAGs, e que a quantidade de ácido hialurônico secretado por fibroblastos Apert foi maior que a secretada por fibroblastos normais. A adição de interleucina 1 e 6 diminuiu a secreção de ácido hialurônico no meio Apert, no entanto não acarretou modificações no meio normal. Em um estudo posterior, esses mesmos autores observaram que os níveis de interleucina 1 e 6 eram mais baixos no meio Apert do que no meio normal (BODO et al., 1998). Locci et al., 1999 compararam a habilidade de osteoblastos Apert e normais de secretarem TGF β -1. Os níveis de TGF β -1 no meio Apert foram maiores do que os observados em osteoblastos normais, com subsequente redução nos níveis de TGF β 1 mediante adição de FGF2.

Uma vez que as GAGs parecem regular a via de sinalização do FGF / FGFR, inibidores de GAGs podem ser drogas potencialmente úteis no tratamento da síndrome de Apert, visando especialmente as desordens dermatológicas encontradas nesses pacientes (McDOWELL et al., 2006).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar morfológica e morfometricamente o tecido conjuntivo da mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert, avaliando a proporção dos constituintes teciduais e componentes da MEC relacionados com a via de sinalização FGF/FGFR e a organização das fibras de colágeno.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

- A proporção dos componentes do tecido conjuntivo.
- A presença e a distribuição de glicosaminoglicanas ácidas (GAGs).
- A organização das fibras colágenas.
- A atividade proliferativa dos fibroblastos.
- A presença e o acúmulo de colágeno tipo I e III, e decorina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS DA PESQUISA

▪ Aprovação do Comitê de Ética

Este trabalho foi desenvolvido dentro dos preceitos éticos recomendados e aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais HRAC/USP, ofício nº. 20/2006-UEP-CEP (Anexo A).

▪ Critérios de Diagnóstico

Cada indivíduo selecionado para este estudo teve seu diagnóstico de síndrome de Apert realizado por equipe médica do HRAC-USP, baseado nos aspectos clínicos da síndrome, caracterizados por cranioestenose com braquicefalia; hipoplasia do terço médio da face e grave sindactilia de mãos e pés (MUSTACCHI; PERES, 2000).

▪ Critérios de Inclusão

Até o ano de 2005, 45 indivíduos com síndrome de Apert estavam matriculados no HRAC/USP. Destes, foram selecionados 12 indivíduos, com idade entre 10 e 30 anos, de ambos os sexos. Todos os indivíduos selecionados apresentavam um aumento de volume da mucosa palatina e indicação de remoção do tecido exuberante e aceitaram participar do projeto tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido. No caso de menores de idade, houve o consentimento do responsável legal. O fato de o indivíduo manifestar desinteresse em participar da pesquisa não afetou seu tratamento em outros setores do HRAC.

▪ Critérios de Exclusão

Foram excluídos deste estudo:

- Indivíduos portadores de próteses superior ou inferior, total e/ou removível.

- Indivíduos com retardo moderado ou avançado do desenvolvimento neuropsicomotor.
- Indivíduos com limitações neurológicas e incapazes de colaborar com a realização dos exames e procedimentos cirúrgicos.
- Indivíduos em uso de medicamentos anticonvulsivantes.
- Indivíduos que não apresentaram indicação para retirada de tecido exuberante da mucosa palatina.

▪ Coleta dos Espécimes

A coleta dos espécimes foi realizada por um cirurgião dentista habilitado da clínica de Periodontia do HRAC/USP. Imediatamente após a coleta os espécimes foram identificados com numeração de 1 a 12 e fixados em formol a 10% tamponado por 48 horas.

▪ Controle do estudo

Os controles para as colorações e análises deste estudo foram obtidos da seguinte maneira:

1- Morfometria: cortes de tecido gengival de seis indivíduos com idade até 50 anos, excluindo fumantes, diabéticos e gestantes, corados com hematoxilina e eosina (HE); cedidos pelo banco de tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2- Histoquímica: três blocos de biópsia de palato, selecionados dos arquivos de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia – Disciplina de Patologia – da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo-FOB/USP, onde foram analisadas as regiões de tecido normal dos cortes.

4.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a fixação os espécimes foram lavados em água corrente durante 12 horas, submetidos à desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec[®] (parafina + resina plástica do Laboratório Merck KGaA, Darmstadt,

Alemanha) em posição adequada para obtenção de corte perpendicularmente a superfície do epitélio e tecido conjuntivo.

Foram obtidos cortes semi-seriados de 5µm de espessura em um micrótomo Jung-Leica® RM2045 (Leica Microsystems GmbH, Alemanha), com um intervalo de 50µm entre os cortes. Todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas antes das colorações específicas. Todos os cortes foram montados em lâmina fosca e laminula (10 x 20 mm) utilizando Entelan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Os cortes corados em hematoxilina e eosina (HE) foram obtidos segundo o procedimento padrão do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – FOB/USP (LUNA, 1968). A análise histológica foi realizada por médico patologista da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a fim de caracterizar o tecido e avaliar os componentes teciduais da amostra.

4.3 PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO

4.3.1 PAS (Periodic Acid-Schiff)

A presença de polissacarídeos simples ou associados a proteínas foi determinada pela técnica do PAS. Nessa técnica o ácido periódico oxida os grupamentos 1-2 glicol, produzindo aldeídos. Estes reagem com a fucsina descorada (reativo de Schiff), formando um composto de adição violeta e insolúvel. A análise desta coloração foi subjetiva e descritiva e comparada com o grupo controle.

Os cortes foram cobertos com ácido periódico 5% (15 minutos), lavados em água corrente (10 minutos), submetidos ao reativo de Schiff (15 minutos) e água sulfurosa (2 minutos), lavados novamente em água corrente (10 minutos), contra-corados com hematoxilina de Harris e lavados por 10 minutos em água corrente.

4.3.2 Alcian Blue

O método histoquímico de Alcian Blue introduzido por Steedman em 1950 coloca em evidência os diversos tipos de glicosaminoglicanas ácidas presentes nas mucinas ou proteoglicanas ácidas, sulfatadas ou não, presentes no tecido conjuntivo em geral. As mucinas ácidas e sulfatas são evidenciadas em pH 2,5 e 1,0 respectivamente (ABDULNOUR-NAKHOUL et al., 2007; GANESH et al., 2007) e coradas em azul. A referência para o grau de intensidade considerado forte foi o tecido glandular mucoso do material controle. Os demais graus de coloração foram classificados em moderado, fraco e ausente e a localização foi caracterizada como focal ou difusa. A análise desta coloração foi descritiva e subjetiva.

Alcian Blue pH 1,0

As lâminas foram cobertas com solução de HCl 0,2N por 3 minutos e cobertas com solução de Alcian Blue 1% (1 hora e 40 minutos), secas e submetidas à montagem padrão.

Alcian Blue pH 2,5

Para esta coloração os cortes foram cobertos com solução de ácido acético 3% (3 minutos), seguido de solução Alcian Blue 1% (40 minutos), lavados em água corrente (10 minutos), banhados em água destilada e contra - corados com Vermelho Nuclear (5 minutos), lavados novamente em água corrente (1 minuto) e secados para montagem.

4.3.3 Picrossírius

A coloração de Picrossírius, preparada especificamente para ser analisada pela técnica do confocal, tem por objetivo revelar a organização dos feixes de fibras colágenas (JUNQUEIRA et al., 1979). Esta coloração baseia-se no alinhamento das moléculas do Sirius Red às moléculas de colágeno, promovendo um aumento da

birrefringência das fibras colágenas. Quando analisadas sob luz polarizada, além de se mostrarem fortemente birrefringentes, as fibras que contêm colágeno assumem cores e intensidades de birrefringência variadas, resultantes de graus variáveis de agregação física dos diferentes tipos de colágeno (MONTES; JUNQUEIRA, 1988).

O colágeno tipo I mostra-se como fibras grossas, muito birrefringentes; o colágeno tipo III aparece sob a forma de fibras finas, fracamente birrefringentes e o colágeno tipo II não forma fibras e mostra uma fraca birrefringência de cor variável (JUNQUEIRA et al., 1979; ZAMBRANO et al., 1982; MONTES, 1996).

Os cortes foram lavados em água destilada (10 minutos), imersos em ácido fosfomolibdico 0,2% (1 minuto), corados com solução de picrossírius (90 minutos), lavadas com ácido clorídrico 0,01 M (2 minutos) seguida por lavagem com álcool 70% (45 segundos); e secados para montagem.

Os cortes corados pelo picrossírius foram analisados pelo sistema computadorizado de análise de imagens, constituído por uma vídeocâmera Nikon® FDX- 35, acoplada a um microscópio óptico, que transmitiram as imagens a um microcomputador equipado com placa digitalizadora e o software Image – Pro-Plus (versão 4.5). Os campos foram escolhidos aleatoriamente em cada lâmina, fotografados em objetiva de 40x e a área de cada imagem foi medida automaticamente por diferencial colimétrico. Os dados foram levados ao programa GraphPad Prism®, para montagem e análise dos gráficos e comparação com o grupo controle.

4.4 PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO

A técnica imunohistoquímica foi empregada com a finalidade de avaliar a presença e a localização específica dos marcadores para a proteína P63 (DAKO, USA), decorina (DAKO, USA) e colágeno I e III (Novotec– FRANCE -colágeno tipo I código: 20111 e colágeno tipo III, código: 20311, Anti-rabbit, diluído em tampão PBS na concentração de 1:500 ml). As marcações seguiram os protocolos de reações utilizados no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Secções semi-seriadas de 5 µm foram colocadas sobre lâminas silanizadas Super-frost Plus (Erviagas, São Paulo, Brasil) e desparafinizadas. Os cortes utilizados para identificação da P63 foram submetidos à recuperação antigênica utilizando tampão citrato (pH 6,0 – 95°C) por 10 minutos e, em seguida foi inativada a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 30%, diluído em metanol a 50%, posteriormente foram submetidos ao bloqueio de sítios inespecíficos com solução de PBS/PSA a 5%, para então os cortes serem incubados por 18 horas a 4°C com anti-P63. Os cortes utilizados para identificação dos colágenos I e III e decorina foram incubados por 3 horas em hialuronidase 0,1 % diluída em solução tampão de pH 6,7 seguido de bloqueio em pbs-bsa 5% diluído em NGS (normal goat serum) 5% por 1 hora antes da incubação com os anticorpos específicos. Após 18 horas de incubação em geladeira a 4° C, os cortes foram lavados com PBS (3 banhos) e incubados com o segundo anticorpo, biotinilado (anticorpo universal DAKO-LSAB), por mais 1 hora em temperatura ambiente. Nos protocolos para identificação do colágeno realizou-se a inibição da peroxidase endógena com peróxido a 100% em metanol, por 15 minutos no escuro, antes da incubação com o anticorpo secundário. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas em PBS e re-incubadas com o complexo Avidina-biotina (Strept ABComplex/HRP-Dako) por 45 min. O imuno-complexo contendo peroxidase foi detectado utilizando o cromógeno 3,3'- diaminobenzidina-HCl/substrato (DAKO,USA) seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's (LUNA, 1968). Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo universal DAKO-LSAB.

Os controles negativos foram sorteados aleatoriamente entre os 12 indivíduos portadores de síndrome de Apert e o anticorpo primário foi substituído por PBS. Como controle positivo externo foi utilizado material de fibromatose gengival hereditária.

A análise do material foi realizada de maneira descritiva, relatando a positividade ou negatividade da marcação das fibras colágenas e quantificando os fibroblastos imunomarcados. Foi considerada marcação intensa (+++) na presença de mais do que 12 células/corte, moderada (++) de 5 a 12 células/corte, fraca (+) de 1 a 4 células/corte e negativa (-) quando da ausência de marcação em todos os fibroblastos do corte.

4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

4.5.1 Análise morfométrica

A análise morfométrica foi usada para quantificar os componentes do tecido conjuntivo, representados pelas fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias e espaços ocupados pela substância fundamental.

Para esta análise foi utilizado método morfométrico baseado nos princípios de estereologia. Nesta metodologia proposta por Weibel (1969), os resultados quantitativos são expressos em valores percentuais dos componentes analisados em um plano bidimensional nos cortes histológicos.

▪ Casualização da amostra

De cada espécime foram obtidas dez lâminas contendo três cortes semi-seriados cada uma. Foi analisado um corte semi-seriado de cada lâmina escolhida aleatoriamente e corada com HE. As lâminas restantes foram submetidas às demais colorações.

Foi utilizado um microscópio binocular Olympus contendo uma ocular de compensação ZEISS kpl 8x, com um retículo de integração II ZEISS e uma objetiva de imersão 100x. O retículo de integração é composto por 10 linhas paralelas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos eqüidistantes. A sobreposição do retículo sobre a imagem histológica permitiu a contagem de pontos presentes no retículo que coincidiram sobre as estruturas a serem analisadas.

O primeiro campo a ser analisado foi localizado logo abaixo do epitélio, seguindo em campos consecutivos, para um total de vinte campos por corte e finalizando com um total de 2000 pontos por corte.

Após a contagem total, calculou-se a média e o desvio padrão dos percentuais obtidos.

▪ **Critérios adotados nas quantificações:**

1. Fibras colágenas: todas as fibras colágenas presentes no tecido conjuntivo foram contadas, uma vez que a coloração utilizada (hematoxilina-eosina) não permite a diferenciação entre os tipos de fibras.
2. Fibroblastos: considerou-se para contagem apenas o núcleo, por restrição do método de coloração que não permite a visualização adequada do citoplasma destas células, o qual se assemelha com a coloração das fibras colágenas.
3. Vasos sanguíneos.
4. Células inflamatórias: foram consideradas neste critério as células inflamatórias polimorfonucleares e monomorfonucleares.
5. Outros componentes do tecido conjuntivo: este critério englobou as regiões provavelmente ocupadas por substância fundamental amorfa, líquido intercelular e exsudato inflamatório.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados da morfometria foi utilizado o teste *t* de Student, levando-se em conta a natureza das distribuições e a variabilidade das mensurações efetuadas. O nível de significância foi fixado em 0,05.

Para a análise dos dados da área ocupada por fibras colágenas obtidas pela técnica do picrossírius entre os pacientes portadores de síndrome de Apert e com o grupo controle foi utilizado o teste de Kruskal – Wallis e a correlação dessas áreas com a idade dos pacientes foi analisada pelo teste de Sperman.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

5.1.1 Controle

O tecido normal evidenciou um epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado, composto por quatro estratos ou camadas representadas pelo estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo ou basal, com a lâmina própria projetando-se para o epitélio sob forma de papilas conjuntivas. A lâmina própria da região, composta por uma faixa de tecido conjuntivo, evidenciou a presença de vasos sanguíneos, fibroblastos, fibras colágenas dispostas em várias direções, substância fundamental amorfa e poucas células inflamatórias (Figura 3A).

5.1.2 Apert

Devido à irregularidade dos tecidos não foi possível a padronização do tamanho e plano de corte.

O epitélio foi classificado como pavimentoso estratificado paraqueratinizado com presença de cristas epiteliais delgadas e irregulares, separadas entre si por papilas conjuntivas, com áreas de intensa acantose. Todos os indivíduos apresentaram graus variáveis de hiperplasia epitelial evidenciada pela fusão das cristas em sua profundidade.

Dois espécimes apresentaram reação inflamatória focal, com cristas epiteliais profundas, infiltrado linfo-plasmocitário, acompanhando os focos inflamatórios do tecido conjuntivo adjacente.

O tecido conjuntivo revelou-se bastante fibroso, com fibras colágenas de trajeto mais linear em várias direções, formando feixes mais espessos do que os do

tecido normal (Figura 3B). Foram observadas áreas tendinosas com fibrócitos em seu interior (Figura 4A) e áreas com fibras mais delgadas e em menor número e marcante presença de fibroblastos em sua periferia (Figura 4B).

Figura 3 – Fotomicrografias de tecido palatino de indivíduo normal (A) exibindo fibras colágenas de trajeto ondulado em várias direções. Mesmo tecido de indivíduo portador de síndrome de Apert (B), o qual apresenta feixes de fibras colágenas mais calibrosos com trajetória mais linear (F) tomando um aspecto mais tendinoso que o tecido de indivíduo normal. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE) 40x

Figura 4 – Fotomicrografias de tecido palatino de um mesmo paciente, portador de síndrome de Apert, evidenciando (A) áreas com predominância de feixes de fibras colágenas seccionadas transversalmente e obliquamente (seta), com presença de fibrócitos e (B) áreas de fibras colágenas mais delgadas (seta) com presença de fibroblastos. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE) 40x

5.2 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS

Observou-se que o tecido conjuntivo exuberante retirado da região palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert é constituído em sua maior parte de fibras colágenas, totalizando em média 72,55% do tecido, seguido pelos espaços ocupados pela substância fundamental amorfa (20,85%), vasos (4,38%), fibroblastos (1,93%) e células inflamatórias (0,88%). A diferença entre os componentes do tecido conjuntivo da mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert e de mucosa normal de indivíduos controle não foi significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias dos resultados dos componentes do tecido conjuntivo da mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert e do grupo controle

Variável	Média Apert	Média Controle	Valor de p
Fibroblasto	1,93 $\pm$ 1,12	2,04 $\pm$ 1,03	0,841
Fibras	72,55 $\pm$ 8,45	75,05 $\pm$ 7,80	0,554
Outros componentes	20,85 $\pm$ 10,17	18,67 $\pm$ 7,40	0,648
Células inflamatórias	0,88 $\pm$ 0,48	1,18 $\pm$ 1,02	0,412
Vasos	4,38 $\pm$ 2,60	3,04 $\pm$ 1,70	0,272

Entretanto, observou-se um maior número de vasos sanguíneos nos indivíduos com síndrome de Apert, que apesar de não significativo, é inversamente proporcional ao número de células inflamatórias, quando comparado ao tecido de indivíduos normais.

5.3 ASPECTOS HISTOQUÍMICOS

5.3.1 PAS

Todos os espécimes se mostraram positivamente corados pelo PAS, embora a marcação tenha sido fraca (Figura 5). Observou-se a presença de vasos sanguíneos de paredes espessas e áreas hialinizadas, com infiltrado inflamatório perivascular composto em sua maioria por elementos mononucleares. A marcação foi mais evidente na parede dos vasos e nas áreas de fibras colágenas delgadas. Não foi observada diferença em relação ao grupo controle.

Figura 5 – Fotomicrografia de tecido palatino de indivíduo portador de síndrome de Apert evidenciando fraca marcação pelo PAS, 40x

5.3.2 Alcian Blue

Esta coloração foi positiva nos dois valores de pH para ambos os grupos, entretanto foi mais forte no grupo portador da síndrome (Figura 6A e B). A diferença mais evidente nas marcações do Alcian Blue entre o tecido Apert e o normal ocorreu no pH 2,5 (Figura 7A e B). O tecido conjuntivo de indivíduos portadores de síndrome de Apert apresentou uma marcação de grau moderado a intenso, com distribuição difusa, tendo por referência os ácinos de glândulas da região submucosa de tecido normal (Figura 8A e B). O mesmo não ocorreu no tecido normal, que apresentou uma marcação fraca (Figura 8C). Houve maior concentração do corante (em ambos os valores de pH) em regiões onde as fibras colágenas estão mais desorganizadas, enquanto que as áreas mais tendinosas, foram menos marcadas ou simplesmente não apresentaram marcação em qualquer dos valores de pH. No grupo controle essa marcação foi considerada fraca e difusa, e ausente em muitas áreas.

Figura 6 – Fotomicrografias de tecido palatino de indivíduos portadores de síndrome de Apert. Evidência de grande quantidade de mucinas ácidas pela coloração Alcian Blue em pH 1,0 (A) e sulfatas em pH 2,5 (B) 40x

Figura 7 – Fotomicrografia de mucosa de palato de indivíduo portador de síndrome de Apert (A) e indivíduo normal (B) evidenciando a diferença na marcação de GAGs no pH 2,5, 10x

Figura 8 – Fotomicrografias de tecido palatino pela coloração Alcian Blue (pH 2,5). (A) Controle em tecido glandular normal; seta indica coloração de intensidade forte 10x; (B) indivíduo portador de síndrome de Apert com intensidade forte e (C) tecido conjuntivo normal com intensidade fraca, 40x

5.3.3 Picrossírius

Para os pacientes portadores de síndrome de Apert a coloração e análise pelo microscópio confocal revelaram a presença de fibras espessas de caráter tendinoso (Figura 9A), organizadas em direções irregulares e áreas de fibras finas (Figura 9B). Os indivíduos do grupo controle apresentaram fibras colágenas espessas (Figura 10A) e algumas áreas de fibras colágenas mais finas (Figura 10B), entretanto em nenhum corte do grupo controle observaram-se fibras tão espessas quanto às observadas nos indivíduos portadores de síndrome de Apert.

A análise estatística da área ocupada pelas fibras colágenas entre pacientes portadores da síndrome de Apert não mostrou diferença estatística significativa (Figura 11). Quando esses dados foram comparados com os dos indivíduos normais, também não se observou diferença significativa (Figura 12).

A análise estatística da correlação da área ocupada pelas fibras colágenas com a idade dos pacientes não evidenciou diferença significativa (Figura 13).

Figura 9 – Fotomicrografia de um mesmo indivíduo, portador de síndrome de Apert, pela técnica do Picrosirius-confocal. Observa-se a presença de fibras espessas em diversas direções, ocupando uma grande área do tecido conjuntivo (A) e áreas de fibras mais delgadas (B), 40x

Figura 10 – Fotomicrografia de indivíduo normal, pela técnica do Picrosírius-confocal. Observa-se a presença de fibras espessas (A) e áreas de fibras mais finas (B), 40x

Figura 11 – Distribuição das medidas do colágeno por área nos pacientes portadores de síndrome de Apert

Figura 12 – Comparação da área ocupada pelo colágeno nos indivíduos controle e nos pacientes portadores de síndrome de Apert

Figura 13 – Correlação da área ocupada pelo colágeno com a idade dos pacientes portadores de síndrome de Apert

5.4 ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

5.4.1 P63

A expressão de P63 para avaliação da taxa de proliferação foi positiva no epitélio em 6 dos 12 espécimes. O controle positivo interno para proliferação foram as células imunomarcadas nas regiões basal e parabasal (Figura 14). Não foi observada atividade proliferativa dos fibroblastos no tecido conjuntivo em nenhum dos espécimes deste estudo.

Figura 14 – Fotomicrografia de tecido palatino de indivíduos portadores de síndrome de Apert, imunolocalização para P63 nas regiões basal e parabasal do epitélio da mucosa, 40x

5.4.2 Colágeno I

Os fibroblastos ativos nas regiões de fibras colágenas delgadas mostraram imunomarcacão positiva para colágeno I, evidenciada por um citoplasma reativo. Nas regiões de fibras espessas não houve células marcadas, indicando baixa produção de colágeno. Apenas um espécime deste trabalho apresentou positividade na maioria dos fibroblastos (+ + +) (Figura 15A) em dois espécimes não houve marcação (-) e em nove espécimes houve marcação de 3 a 6 fibroblastos por lâmina (+). As fibras de colágeno I foram uniformemente marcadas em toda a lâmina para todos os indivíduos deste estudo, entretanto em diferentes graus de intensidade (Figura 16).

5.4.3 Colágeno III

O padrão de marcação em regiões de fibras espessas e delgadas foi semelhante à marcação do colágeno I. Entretanto em quatro espécimes não foram observados fibroblastos positivos (-); cinco espécimes apresentaram um pequeno número de fibroblastos marcados (+); dois espécimes apresentaram quantidade moderada (+ +) e um espécime apresentou positividade na maioria dos fibroblastos (+ + +) (Figura 15B).

5.4.4 Decorina

Sete espécimes não apresentaram marcação para decorina (-), quatro espécimes apresentaram um pequeno número de fibroblastos marcados (+); e um espécime apresentou uma quantidade moderada de fibroblastos positivos (+ +). A marcação foi negativa na região de fibras colágenas e evidente ao redor dos vasos (Figura 15C).

Figura 15 – Fotomicrografia de mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert e imunomarcção para colágeno I (A), colágeno III (B) e decorina (C)

Figura 16 – Fotomicrografia de mucosa palatina de indivíduos portadores de síndrome de Apert, com imunomarcagem para colágeno I, evidenciando diferentes graus de intensidade, 40x

Os resultados da imunohistoquímica encontram-se agrupados na Tabela 3. É possível notar que apenas um indivíduo apresentou marcação negativa para todos os anticorpos, e outro indivíduo apresentou marcação intensa para colágeno I e III e marcação moderada para decorina, diferenciando-os dos outros indivíduos.

Tabela 3 – Resultado das marcações para colágeno I e III; e decorina em indivíduos portadores de síndrome de Apert

Nº do espécime	Colágeno I	Colágeno III	Decorina
1	+	-	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	+	-
5	+	++	-
6	-	-	-
7	+	+	-
8	+	-	-
9	+++	+++	++
10	+	+	+
11	-	++	-
12	+	++	+

(-) nenhum fibroblasto imunomarcado em todo o corte.

(+) 3 a 6 fibroblastos imunomarcados por corte.

(++) 7 a 10 fibroblastos imunomarcados por corte.

(+++) mais que 10 fibroblastos imunomarcados por corte.

6 *DISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi iniciado a partir de uma necessidade real, rotineira e instigante da Clínica de Periodontia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais de Bauru. Os pacientes portadores de síndrome de Apert, muitos deles acompanhados nesta instituição desde sua infância, chegaram à adolescência. A necessidade funcional da correção ortodôntica une-se então à preocupação com a aparência, característica inerente à idade. Muitos indivíduos com síndrome de Apert apresentam inteligência normal ou próxima a ela (PATTON et al., 1988), concordando com nosso estudo, onde os pacientes selecionados não apresentaram grau severo de deficiência mental.

Para a colocação de bandas e acessórios ortodônticos foi necessária a excisão cirúrgica do aumento volumétrico da mucosa de palato, até então amplamente relatado na literatura (SOLOMON et al., 1973; KREIBORG; COHEN, 1992; ALBUQUERQUE e CAVALCANTI, 2004; DALBEN et al., 2006; LETRA et al., 2007), mas não relacionado à abordagem cirúrgica. Fato que surpreendeu os cirurgiões dentistas foi a proliferação tecidual exuberante alguns meses após a gengivectomia, sendo o resultado final pior que o inicial. Iniciou-se então uma extensa revisão bibliográfica onde foi observado que até os anos 70 e 80 a maioria dos trabalhos limitavam-se apenas aos relatos de sinais clínicos associados à síndrome de Apert. Na década de 90, com a evolução da anestesiologia e cirurgia as técnicas cirúrgicas para correção de crânio e mãos foram amplamente relatadas. Finalmente, quando em 1995, Wilkie et al., determinaram a base molecular para a síndrome de Apert as pesquisas abordando a genética molecular tiveram seu início. Entretanto os estudos foram direcionados para a alteração de maior gravidade na síndrome: a craniosinostose. Utilizando osteoblastos e fibroblastos das suturas cranianas obtidas durante as cirurgias corretivas de crânio, diversos autores observaram o comportamento dessas células em estudos *in vitro* (BODO et al., 1997, BODO et al., 1998; LOCCI et al., 1999).

Diante de tal revisão os resultados obtidos no presente estudo só podem ser discutidos sob o prisma dos conhecimentos básicos da histologia e da biologia molecular, visto que não há trabalho na literatura mundial que tenha estudado o

aumento volumétrico da mucosa de palato na síndrome de Apert após a descoberta da base molecular envolvida no processo.

A análise histológica do material revelou que o epitélio da mucosa de palato duro dos pacientes com síndrome de Apert apresenta a mesma constituição do epitélio de tecido normal, composto pelas camadas córnea, granulosa, espinhosa e germinativa como referido por Douglas (1998), Junqueira e Carneiro (2008a) e Nanci (2008). Entretanto foi evidente que o epitélio de todos os indivíduos portadores de síndrome de Apert apresentava áreas de intensa acantose e hiperplasia epitelial. A irregularidade do tecido excisado e o difícil acesso a área cirúrgica impossibilitaram a padronização do plano de corte, limitando a comparação da espessura do epitélio entre pacientes portadores de síndrome de Apert e o grupo controle. Citações como a referida por Douglas (1998) de que existe possibilidade de interações recíprocas entre o epitélio da mucosa oral e o mesênquima subjacente, associada as informações sobre a base molecular da síndrome de Apert definida pela mutação do FGFR2 (WILKIE et al., 1995 b) direcionaram este trabalho para o estudo do tecido conjuntivo da mucosa oral.

A análise histológica do tecido conjuntivo dos pacientes portadores de síndrome de Apert revelou um tecido com feixes de fibras colágenas espessas e tendinosas, com as fibrilas tendo um trajeto linear, fato não observado nos indivíduos normais. Solomon et al. (1973) relataram a presença de grandes áreas ocupadas por fibras de colágeno irregulares com acúmulo de fibroblastos estrelados suspensos em um estroma abundante, entretanto foi observado neste estudo que, em uma mesma lâmina, existiam áreas ocupadas por feixes de fibras colágenas espessas apresentando pequena quantidade de fibroblastos e áreas onde as fibras mostraram-se mais delgadas com presença de fibroblastos em maior quantidade.

A análise morfométrica de ambos os grupos evidenciou que o tecido conjuntivo, constituído em sua maior parte por fibras colágenas, assim como refere Junqueira e Carneiro (2008b), não apresentou diferença estatística significativa na proporcionalidade de seus componentes, apesar da evidente diferença entre a espessura dos feixes de fibras de colágenas entre os dois grupos. Este resultado mostra que o tecido está aumentado em sua totalidade e não em função de aumento de algum de seus componentes. Como explicar então o aumento exuberante do tecido após a gengivectomia? Este tecido não foi analisado neste estudo, mas os

dados obtidos com o tecido excisado nos reportam a atividade fibroblástica relacionada ao colágeno e a produção de GAGs. Segundo Yee et al. (1999), fibroblastos quiescentes apresentam uma mudança rápida na expressão de centenas de genes quando ativados pelo contato com o plasma. Curiosamente os fibroblastos gengivais compartilham muitas propriedades com os fibroblastos fetais (SCHOR et al., 1996). Esta poderia ser uma hipótese para justificar a exuberante proliferação tecidual da mucosa de palato nos pacientes portadores de síndrome de Apert após a abordagem cirúrgica. Com a expressão de genes que só seriam expressos na vida fetal, o fibroblasto gengival Apert, passaria então a evidenciar um desequilíbrio na produção de componentes da MEC, devido ao aumento da afinidade e perda de especificidade de ligação entre FGFs e o FGFR2 mutante como relataram Yu e Ornitz (2001) e Ibrahimi et al. (2005). Neste caso, a mutação teria influência direta nos processos envolvidos na cicatrização gengival. Corroborando esta hipótese temos os relatos de Hakkinen et al. (2000) que observaram que diversas moléculas expressas apenas durante o desenvolvimento embrionário são encontradas no tecido de granulação durante o processo de reparação de feridas. No tecido gengival Apert pode, então, haver a super expressão de FGFR2, deflagrando assim o sinal para produção de GAGs, colágeno e TGF β , alterando o processo cicatricial final.

O papel das GAGs neste processo também parece ser determinante para as alterações fenotípicas, visto que a quantidade e a qualidade das GAGs são passíveis de alterações em resposta a fatores ambientais. Além disso, a interação GAGs/FGF/FGFR depende em grande parte de seqüências específicas nas moléculas de GAGs (TROWBRIDGE, 2002). Nesse contexto a atuação das GAGs na sinalização FGF/FGFR pode regular processos fisiológicos celulares, como referem Carinci et al. (2005). Esses autores observaram que a regulação nos processos de ossificação e fusão de estruturas cranianas são dependentes do microambiente celular.

A avaliação da presença de GAGs no tecido conjuntivo da mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert e nos pacientes do grupo controle não evidenciou diferença quando analisada pela coloração de PAS. Solomon et al. (1973) também referiram em seu trabalho que não houve acúmulo de mucopolissacarídeos neutros nos pacientes portadores de síndrome de Apert. Os

resultados obtidos pela coloração de Alcian Blue no trabalho de Solomon et al. (1973) assemelharam-se aos resultados obtidos no presente estudo. A marcação foi mais intensa e mais difusa no tecido conjuntivo da mucosa palatina de portadores de síndrome de Apert do que no grupo controle, entretanto o trabalho de Solomon et al. (1973) não ilustra esta observação. A coloração evidenciou proteoglicanas ácidas e sulfatadas em quantidades maiores no indivíduo com a síndrome do que no tecido de indivíduos normais. Em 1997, Bodo et al. confirmaram que os fibroblastos Apert de periósteo produzem grande quantidade de GAGs e que a quantidade de ácido hialurônico secretado por essas células foi maior que a secretada por fibroblastos normais. A alteração da especificidade e o aumento da afinidade do FGFR2 mutante para a maioria dos FGFs (YU e ORNITZ, 2001) poderia estar relacionada ao aumento do “turnover” da MEC. Com base nos relatos da literatura e nos resultados deste estudo podemos sugerir que combinações específicas de GAGs/FGF ativando formas mutantes de FGFR2, como observados por McDowell et al. (2006) poderiam levar ao aumento da produção das próprias GAGs.

Além do evidente acúmulo de GAGs na mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert, este estudo também mostrou a diferença na arquitetura da fibras colágenas, evidenciado pela coloração de picrossírius e analisada pelo microscópio confocal. Apesar da área ocupada pelas fibras colágenas não apresentar diferença estatística significativa quando comparada ao grupo controle, as fibras colágenas do tecido Apert mostram-se mais espessas e unidas em algumas áreas quando comparadas ao grupo controle. Este resultado confirma o observado pela análise histológica, porém a análise pelo microscópio confocal mostrou-se mais eficaz para a identificação da arquitetura das fibras colágenas. A análise estatística da correlação entre a área ocupada pelas fibras colágenas e a idade dos pacientes não foi significativa, embora Solomon et al. (1973) refiram que o aumento volumétrico da mucosa palatina nos pacientes portadores de síndrome de Apert é idade dependente. Isto pode ser devido ao fato de os autores terem estudado indivíduos na faixa etária de 1 a 17 anos, enquanto neste estudo as idades estavam compreendidas entre 10 e 30 anos. Pode-se observar com esses resultados que a área ocupada pelas fibras colágenas não aumenta com a idade. É muito provável que o tecido aumente como um todo, mantendo a proporcionalidade de todos os seus componentes.

A imunomarcação pelo P63 foi positiva na camada basal e parabasal confirmando a atividade proliferativa característica desta região, como referido por Douglas (1998) Também mostrou que os fibroblastos do tecido conjuntivo palatino do grupo Apert não apresentaram atividade proliferativa, assemelhando-os a fibroblastos de tecido normal os quais possuem uma taxa de proliferação muito baixa (YER et al., 1999). Este resultado é coerente com a análise morfométrica que evidenciou quantidade de fibroblastos por área analisada, semelhante ao tecido normal, sugerindo não haver proliferação anormal dos fibroblastos.

A imunomarcação dos colágenos I e III teve por finalidade evidenciar a atividade metabólica dos fibroblastos para esses produtos e identificá-los na MEC. As fibras de colágenos I e III, marcadas uniformemente em toda a lâmina e em todos os pacientes portadores de síndrome de Apert deste estudo, confirmam os resultados da análise histológica, morfométrica e histoquímica. Os profissionais envolvidos na retirada do tecido gengival dos indivíduos com síndrome de Apert atendidos no HRAC/USP referiram um tecido fibroso com resistência a passagem do bisturi, evidenciando sensação de tecido calcificado que sugeria fibrose tecidual. Segundo Wynn (2008) a fibrose é definida por crescimento exuberante, firme e/ou cicatricial de vários tecidos, atribuídos à deposição excessiva dos componentes da MEC, incluindo o colágeno. Uma avaliação posterior de outros componentes da MEC poderá esclarecer esse relato clínico, visto que a morfometria não evidenciou aumento na proporcionalidade dos componentes do tecido conjuntivo, mas pode haver alteração na constituição da MEC. A presença de fibroblastos imunomarcados para os colágenos I e III apenas na região de fibras delgadas evidenciou atividade metabólica nesta região na maioria dos pacientes portadores de síndrome de Apert, porém a maioria dos pacientes mostrou imunomarcação fraca a moderada e apenas um paciente mostrou positividade na maioria dos fibroblastos da lâmina. O paciente em questão apresentou marcação forte para Alcian Blue, com áreas de acúmulo de GAGs e fibras bastante delgadas em toda a lâmina. Na análise morfométrica apresentou uma área classificada como “outros componentes do tecido conjuntivo” maior que dos outros pacientes, porém sem diferença estatisticamente significativa. Diferente da maioria dos pacientes, este paciente também apresentou imunomarcação dos fibroblastos para decorina em quantidade moderada. Sete de doze pacientes deste estudo não apresentaram marcação citoplasmática da

decorina e a marcação foi negativa na região das fibras de colágeno. Kahari et al (1991) referiram que a decorina pode sofrer inibição do TGF β e Locci et al (1999) relataram que osteoblastos Apert secretaram maior quantidade de TGF β que osteoblastos normais, em seu estudo *in vitro*. A presença do TGF β na mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert deste estudo pode estar evidenciada por sua ação inibitória sobre a decorina, como também nos resultados evidenciados pelo Alcian Blue com acúmulos de GAGs, visto que o TGF β é crítico para o aumento na formação e deposição da MEC. A presença da decorina concentrada ao redor de vasos foi também observada por Corrêa et al. (2005) no estudo do líquen escleroso vulvar.

No início da investigação da hiperplasia da mucosa palatina nos indivíduos portadores de síndrome de Apert atendidos no HRAC/USP desenvolvemos outra linha de pesquisa, a cultura primária dos fibroblastos para avaliação de sua taxa de proliferação. Essa linha de pesquisa baseou-se em trabalhos com cultura primária de fibroblastos Apert (BODO et al., 1997; BODO et al., 1998; LOCCI et al., 1999), mas infelizmente o índice de contaminação na cultura inviabilizou a continuidade do projeto. Os autores citados obtiveram fibroblastos de um leito cirúrgico asséptico, em cirurgias de crânio, onde amostras de periósteo foram coletadas e os fibroblastos isolados. A evolução dos métodos de prevenção de infecção hospitalar aliada ao fato de se tratar de uma cirurgia limpa favorece a cultura celular sem contaminações. Em nosso trabalho inicial, apesar de todas as precauções para evitar a contaminação secundária, as culturas apresentaram crescimento bacteriano. Cultivar células a partir de um leito contaminado, de pacientes com dificuldade de higienização bucal, com evidenciado por Múfalo et al. (2009) tornou-se um fator limitante para a continuidade desta parte do projeto.

Mesmo diante da impossibilidade da avaliação da taxa de proliferação do fibroblasto, o presente trabalho pode esclarecer alguns pontos até então obscuros na constituição do tecido hiperplásico da mucosa de palato nos indivíduos portadores de síndrome de Apert. Os resultados aqui apresentados com base na análise histoquímica, mostraram uma variação na quantidade de GAGs do tecido conjuntivo da mucosa palatina entre os indivíduos com síndrome de Apert. Assim também a imunomarcação colágeno tipo I e III e decorina mostrou variação de intensidade entre os indivíduos com a síndrome. Essa variação entre indivíduos com

a mesma mutação evidencia que existem outros fatores envolvidos na fisiopatologia da hiperplasia de mucosa bucal na síndrome de Apert que ainda não foram esclarecidos. Carinci et al. (2005) referem que alterações na composição da MEC podem explicar a alteração de processos osteogênicos e esclarecer as variações patológicas no desenvolvimento craniano em consequência de mutações no FGFR2. Os autores ressaltam que as citocinas da MEC são secretadas de maneira parácrina e autócrina e são capazes de modificar a MEC. Uma vez que o microambiente extracelular afeta os processos regulatórios que delineiam a ossificação e fusão das suturas durante a morfogênese do crânio (Carinci et al., 2005), a MEC assume um papel fundamental também na fisiopatologia do processo cicatricial da mucosa oral na síndrome de Apert. Outro fato importante é que não foram encontrados na literatura relatos de cicatriz hipertrófica na pele de indivíduos portadores de síndrome de Apert, limitando essa reação cicatricial a mucosa oral. A partir de tais observações e com base em estudos cristalográficos das ligações FGF/FGFR/GAG, que esclareceram diversas vias de sinalização tanto extra quanto intracelulares (ESWARAKUMAR, et al., 2005; MOHAMMADI et al., 2005), trabalhos posteriores podem elucidar outros fatores envolvidos neste processo cicatricial, de forma a entender a dinâmica da reparação tecidual, e mais importante, a aplicação de biotecnologia específica para desenvolvimento de medicamentos que bloqueiem parcialmente a ligação FGF/FGFR/GAGs, promovendo um equilíbrio adequado no processo cicatricial.

Tendo em vista que o “turnover” do colágeno e a remodelação da MEC são regulados por metaloproteinases e seus inibidores, estudos posteriores dessas enzimas poderão auxiliar na caracterização dos processos cicatriciais em pacientes portadores de síndrome de Apert, como também o estudo da expressão de FGFR2, FGFs e TGF β . Além disso, a cultura de fibroblastos da mucosa oral desses pacientes é um desafio a ser vencido.

Este trabalho apenas toca a superfície dos segredos dos fibroblastos Apert que se tornam, a cada dia, fonte de surpresa e fascínio para comunidade científica mundial que olha não apenas uma mutação, mas o ser humano que a carrega.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Pela análise da mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert pode-se concluir:

- A análise da proporcionalidade dos componentes do tecido conjuntivo dos pacientes portadores de síndrome de Apert mostrou que não há diferença quando comparada ao tecido normal.
- Existe maior quantidade de glicosaminoglicanas na matriz extracelular em pacientes portadores de síndrome de Apert do que em indivíduos normais.
- As fibras colágenas na mucosa palatina de pacientes portadores de síndrome de Apert apresentam-se organizadas e densas em algumas áreas enquanto mostram-se delgadas em outras, diferente do tecido normal, que apresenta maior uniformidade na arquitetura das fibras colágenas.
- Os fibroblastos da mucosa palatina dos pacientes portadores de síndrome de Apert não apresentam atividade proliferativa evidente.
- A produção de colágeno I e III foi observada na maioria dos pacientes portadores de síndrome de Apert.
- Não foi evidenciada a presença de decorina na MEC dos pacientes portadores de síndrome de Apert.

O aumento de volume da mucosa de palato duro nos indivíduos portadores de síndrome de Apert, tido na literatura mundial como hiperplasia, evidencia o crescimento tecidual sem predomínio de qualquer um dos componentes do tecido conjuntivo, apesar de os indivíduos com a síndrome apresentarem maior espessura das fibras colágenas e maior acúmulo de GAGs que indivíduos normais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abdulnour-Nakhoul S, Nakhoul NI, Wheeler Sa, Haque S, Wang P, Brown K, et al. Characterization of esophageal submucosal glands in pig tissue and cultures. *Dig Dis Sci*. 2007;52(11):3054-65.

Al Haj Zen A, Lafont A, Durand E, Brasselet C, Lemarchand P, Godeau G, et al. Effect of adenovirus-mediated overexpression of decorin on metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and cytokines secretion by human gingival fibroblasts. *Matrix Biol*. 2003 May;22(3):251-8.

Albuquerque MAP, Cavalcanti MGP. Computed tomography assessment of Apert syndrome. *Braz Oral Res*. 2004;18(1):35-9.

Anderson J, Burnsh D, Enriquez-Harris P, Wilkie A, Heath JK. Apert syndrome mutation in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for fgf ligand. *Hum Mol Genet* 1998;7:1475-1483.

Apert Ec. De L'acrocéphalosindactylie. *Bull Soc Med Hop Paris* 1906; 23:1310-1313 apud Cunningham MI, Seto MI, Ratisoontorn C, Heike CI, Hing Av. Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthod Craniofac Res*. 2007;10(2):67-81.

Arroyo Carrera I, Martínez-Frías MI, Marco Pérez Jj, Paisán Grisolia L, Cárdenes Rodríguez A, Nieto Conde C, et al. Apert syndrome: clinico-epidemiological analysis of a series of consecutive cases in Spain. *An Esp Pediatr*. 1999;51(6):667-72.

Avantaggiato A, Carinci F, Curioni C. Apert's syndrome: cephalometric evaluation and considerations on pathogenesis. *J Craniofac Surg*. 1996;7(1):23-31.

Blank CE. Apert Syndrome (A Type Of Acrocephalosyndactyly): observation on a British series of thirty-nine cases. *Ann Hum Genet*. 1960; 24:151-164 apud Smith, DW Síndromes de malformações congênitas. São Paulo: Editora Manole; 1985. Cap 1, p:320-21.

Bodo M, Carinci F, Baronit T, Giammarioli M, Bellucci C, Bosi G, et al. Apert syndrome: diferencial in vitro production of matrix macromolecules and its regulation by interleukins. *Eur J Of Clin Invest* 1997;27:36-42.

Bodo M, Carinci F, Baroni T, Becchetti E, Bellucci C, Giammarioli M, et al. Interleukin pattern of Apert fibroblasts in vitro. *Eur J Cell Biol.* 1998;75(4):383-8.

Britto,AJ, Chan JCT, Evan RD, Orth M, Hayward RD, Jones BM. Differential expression of fibroblast growth factor receptors in human digital development suggests common pathogenesis in complex acrosyndactyly and craniosinistosys. *Plast Reconstr Surg*, 2001; 107(6)1331-8.

Broxado APF, Mota AP, Rocha MCBS, Pastor IMO, Vidal SM, Alves Neto AA. Síndrome de Apert. Relato de caso. *Rev. ABO Nac.* 1998/9, 6(6): 385-9.

Carinci F, Pezzetti F, Locci P, Becchetti E, Carls F, Avantageggiato A, et al. Apert and Crouzon syndromes: clinical findings, genes and extracellular matrix. *J Craniofac Surg.* 2005;16(3):361-8.

Carinci P, Becchetti E, Baroni T, Carinci F, Pezzetti F, Stabellini G. Extracellular matrix and growth factors in the pathogenesis of some craniofacial malformations. *Eur J Histochem.* 2007;51 (Suppl 1):105-15.

Chellaia A, Yuan WI, Chellaia M, Ornitz Dm. Mapping Ligand Binding Domains In Chimeric Fibroblast Growth Factor Receptor Molecules. Multiple regions determine ligand bindings specificity. *J Biol Chem.* 1999;274:34785-94.

Cohen MMJr, Kreiborg S. The Central Nervous System In The Apert Syndrome. *Am J Med Genet*,1990;35:36-45.

Cohen MMJr,Kreiborg S, Lammer Ej, Cordero JF, Mastroiacovo P, Erickson JD, et al. Birth prevalence study of Apert syndrome. *Am J Med Genet* 1992;42(5):655-9.

Cohen MMJr, Kreiborg S. Visceral Anomalies In The Apert Syndrome. *Am J Med Genet.*1993;45(6):758-60.

Cohen MM, Kreiborg S. New indirect method for estimating the birth prevalence of the Apert syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992;21(2):107-9.

Cohen MMJr, Kreiborg S. Cranial size and configuration in the Apert syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1994;14(3):153-62.

- Corrêa AC, Azevedo LMS, Almeida GL, Cuzzi T, Takiya CM. Decorina e condroitim sulfato na remodelação da matriz extracelular do línquen escleroso vulvar. *An. Bras. Dermatol.* 2005;80 (Supl3):307-13.
- Coulier F, Pontarotti P, Roubin R, Hartung H, Goldfarb M, Birnbaum D. Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J Mol Evol.* 1997;44:43-56.
- Crow JF. Age and sex effects on human mutation rates: an old problem with new complexities. *J Radiat Res (Tokyo).* 2006;47 (Supl B):B75-82.
- Cunningham MI, Seto MI, Ratisoontorn C, Heike CI, Hing Av. Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10(2):67-81.
- Czeizel Ae, Elek C, Susánszky E. Birth prevalence study of the Apert syndrome. *Am J Med Genet.* 1993;45(3):392-3.
- Dalben GS, Neves LT, Gomide MR. Oral findings in patients with apert syndrome. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(6):465-9.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol.* 1997;136:729-43.
- Degiovanni CV, Jong C, Woollons A. What syndrome is this? Apert syndrome. *Pediatr Dermatol.* 2007;24(2):186-8.
- Dell KR, Williams LT. A novel form of fibroblast growth factor receptor 2. Alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. *J Biol Chem.* 1992;267(29):21225-9.
- Douglas CR. Fisiologia da mucosa oral. In Douglas CR. *Patofisiologia oral*. São Paulo: Pancast ;1998. p.499-512.
- Dowd CJ, Cooney CL, Nugent MA. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *J Biol Chem.* 1999;274(8):5236-44.

Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest.* 2001;108(2):169-73.

Eswarakumar VP, Lax, I, Schlessinger J. Cellular signaling by growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2005;16:139-49.

Ferdous Z, Wei VM, Iozzo R, Höök M, Grande-Allen KJ. Decorin-transforming growth factor- interaction regulates matrix organization and mechanical characteristics of three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35887-98. Epub 2007 Oct 17.

Ganesh IM, Subramani D, Halagowder D. Mucin glycoarray in gastric and gallbladder epithelia. *J Carcinog.* 2007;6:10.

Geist ET, Diaz JH. Management OF. The asthmatic patient undergoing dental surgery. *J Am Dent Assoc.* 1982;105(1):65-9.

Givol D, Yayon A. Complexity of fgf receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *F A S E B J.* 1992;6:3362.

Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW. The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Hum Genet.* 2003;73(4):939-47. Epub 2003 Jul 31.

Gonçalves et al. Acrocefalosindactilia- aspecto clínico radiográfico. *Radiol Bras.* 1985;18(2):134-7.

González CH, Kim CA, Bresolini AMB, Plese JPP. Case in focus. *Pediatrics, São Paulo,* 1986;8(2):110-13.

Goriely A, Mcvean GA, Röjmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AO. Evidence for selective advantage of pathogenic fgfr2 mutations in the male germ line. *Science.* 2003;301(5633):643-6.

Häkkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 2000. 2000;24:127-52.

Ibrahimi O, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM. Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(13):7182-7187.

Ibrahimi OA, Chiu ES, McCarthy JG, Mohammadi M. Understanding the molecular basis of Apert syndrome. *Plast Reconstr Surg*. 2004;115(1):264-70.

Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*. 1999;274(27):18843-6.

Jang JH, Shin, KH; Park, JG. Mutations in fibroblast factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res*.2001; 61(9):3541-3.

Johnson DE, Willians LT, Gritli-Linde A, Lewis P, McMahon AP, Linde A. Structural and functional diversity in the fgf receptor multigene family. *Adv Cancer Res*.1993;60: 1-41.

Junqueira CI, Carneiro J. O trato digestivo. In: Junqueira CI, Carneiro J. *Histologia básica*, 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008, 284- 316. (A)

Junqueira CI, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Junqueira CI, Carneiro J. *Histologia Básica* 11 ed 2008, 10 Ed, Guanabara Koogan S.A.;5: 91-123. (B)

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrossírius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;1:447-55.

Kähäri VM, Larjava H, Uitto, J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (pg) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (pgi), and versican (large fibroblast pg) but down-regulates decorin (pgii) mrna levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem*. 1991;266:10608-15.

Kreiborg S, Cohen MM. The oral manifestation of Apert syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol*.1992;12:41-48.

Kreiborg S, Marsh JL, Cohen MM Jr, Liversage M, Pedersen H, Skovby F, et al. Comparative three-dimensional analysis of ct-scans of the calvaria and cranial base in Apert and Crouzon syndromes. *J Craniomaxillofac Surg*. 1993;21(5):181-8.

Kresse H, Schönherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol.* 200;189(3):266-74.

Kuwaba K, Kobayashi M, Nomura Y, Irie S, Koyama Y. Size control of decorin dermatan sulfate during remodeling of collagen fibrils in healing skin. *J Dermatol Sci.* 2002;29:185-94.

Leof Eb, Proper Ja, Goustin As, Shipley Gd, Dicorleto Pe, Moses Hl. Induction of c-sis mrna and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:2453-7.

Letra A, Almeida ALPF, Kaizer R, Esper A, Sgarbosa SHPV, Granjeiro JM. Intraoral features of Apert syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(5):e38-41.

Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellén L. Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 1998;273(39):24979-82.

Liu W, Wang DR, Cao Yl. Tgf-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2004;4(1):123-36.

Locci P, Baroni T, Pezzetti F, Lilli C, Marinucci L, Martinese D et al. Differential in vitro phenotype pattern, transforming growth factor-beta(1) activity and mrna expression of transforming growth factor-beta(1) in Apert osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 1999;297(3):475-83.

Lomri A, Lemonnier J, Hott M, Parceval N, Lajeunie E, Munnichi A, et al. Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *J Clin Invest.* 1998;101: 1310.

Luna, L. G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3^a ed. New York, Mcgraw-Hill Book Company, 1968;p.36-38.

Marshall Ri, Barthold Pm, Medication Induced Gingival Overgrowth. *Oral Disease* 1998; 4(3):130-151.

Massagué J. Tgf-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.

Mcdowell LM, Fraizer BA, Studelska DR, Giljum K, Chen J, Yu K, et al. Inhibition or activation of Apert syndrome fgfr2 (s252w) signaling by specific glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 2006;281(11):6924-30.

Mcintosh I, Bellus GA, Jabs EW, The pleiotropic of fibroblast growth factor receptors in mammalian development. *Cell Struct And Funct*.2000;25:85-96.

Mohammadi M, Shaun KO; Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*.2005;16:1007-137.

Moloney DM, Slaney SF, Oldridge M, Wall AS, Sahlin P, Stenman G et al. Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nature Genetics*.1996;13:48-53.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems.*Cell Biol Int*. 1996;20(1):15-27.

Montes GS, Junqueira LCU. Histochemical localization of collagen and of proteoglycans in tissues. In: Nimmi, M.E. (Ed). *Collagen*. Boca- Raton: Crc Press.1988;v.2, p.41-72.

Moscattello DK, Santra M, Mann DM, Mcquillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *Clin Invest*. 1998;101(2):406-12.

Múfalo OS, Kaizer ROF, Dalben GS, Almeida ALPF. Comparison of periodontal parameters in individuals with syndromic craniosynostosis. *J Appl Oral Sci*.2009;17(1):13-20.

Mustacchi Z, Peres S. *Genética baseada em evidências*. São Paulo: Cid Editora;2000. p.374-8.

Mustafá D, Lucas VS, Junod P, Evans R, Mason C, Roberts GJ. The dental health and caries- related microflora in children with craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J*. 2001;28:629-35.

Nanci A. Oral mucosa. Nanci A.In: *Tem Cate's Oral histology*. Philadelphia; Mosby Elsevier, 2008.p.319-57.

Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(2):115-20.

Ornitz, D.M. Fgfs, heparan sulfate and fgfrs: complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000;22:108-112.

Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, et al. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.* 1993;158:475-86.

Ostrovsky O, Berman B, Gallagher J, Mulloy B, Fernig DG, Delehedde M, et al. Differential effects of heparin saccharides on the formation of specific fibroblast growth factor (fgf) and fgf receptor complexes. *J Biol Chem.* 2002; 277(4):2444-53.

Patton MA, Goodship J, Hayward R, Landson R. Intellectual development in Apert's syndrome: a long term follow up 29 patients. *J Med Genet.* 1988;25:164-7.

Peterson SJ, Pruzansky S. Palatal anomalies in the syndromes of Apert and Crouzon. *Cleft Palate J.* 1974 Oct;11:394-403.

Quintero-Rivera F, Robson CD, Reiss RE, Levine D, Benson C, Mulliken JB, et al. Apert syndrome: what prenatal radiographic findings should prompt its consideration? *Prenat Diagn.* 2006;26(10):966-72.

Ravanti L, Häkkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J, et al. Transforming growth factor β induces collagenase-3 (mmp-13) expression by human gingival fibroblast via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1999;274:37292-300.

Reed CC, Iozzo R. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.* 2002;19(4-5):249-55.

Roberts AB. The ever-increasing complexity of tgf- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:3-5.

Scott JE, Haigh M. Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in 'critical-electrolyte-concentration' techniques. *Biochem J.* 1988;253:607-10.

Shklar G. Cavidade oral, maxilares e glândulas salivares. In: Robbins SI, Cotran RS. Patologia estrutural e funcional. 1983, Cap 19, 732-758.

Schor SL, Ellis I, Irwin CR, Banyard J, Seneviratne K, Dolman C, et al. Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. Oral Dis. 1996;2:155-66.

Silva, GM. IL-4 modula a resposta proliferativa induzida por fgfb em células da retina. (Dissertação), Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal Fluminense, 2006.

Smith DW. Síndromes de malformações congênitas. 3 ed. São Paulo: Editora Manole, 1985. p. 320-21.

Solomon LC, Medenica M, Pruzanski S, Kreiborg S. Apert syndrome and palatal mucopolysaccharides. Teratology. 1973;8:287-292.

Tolarova MM, Harris JA, Ordway DE, Vargervik K. Birth prevalence, mutation rate, sex ratio, parents' age, and ethnicity in Apert syndrome. Am J Med Genet. 1997;72(4):394-8.

Trowbridge JM, Rudisill JA, Ron D, Gallo RI. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (fgf-7). J Biol Chem. 2002;277(45):42815-20. Epub 2002 Sep 4.

Verma S, Draznin M. Apert syndrome. Dermatol Online J. 2005 Mar 1;11(1):15.

Von Gernet S, Golla A, Ehrenfels Y, Schuffenhauer S, Fairley JD. Genotype-phenotype analysis in Apert syndrome suggests opposite effects of the two recurrent mutations on syndactyly and outcome of craniofacial surgery. Clin Genet. 2000;57(2):137-9.

Wang Y, Xiao R, Yang F, Karim BO, Iacovelli AJ, Cai J, et al. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR^{+/S252W} mouse. Develop. 2005; 132:3537-48.

Webster MK, Donoghue DJ. Fgfr activation in skeletal disorders: too much of a good thing. Trends Genet. 1997;13:178-182.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969;26:235-302.

Wilkie AO. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 16,187-203.

Wilkie AO, Morriss-Kay GM, Jones EY, Heath JK. Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol*. 1995a;5(5):500-7.

Wilkie AO, Slaney SF, Oldridgem M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockely AD, et al. Apert syndrome results from localized mutations of *fgfr2* and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet* 1995b;9(2):165-72.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-200.

Yacubian-Fernandes A, Palhares A, Giglio A, Gabarra Rc, Zanini S, Portela L, et al. Apert syndrome: factors involved in the cognitive development. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005;63(4):963-8.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991;64(4):841-8.

Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*. 1990;346(6281):281-4.

Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*. 1992;267(14):9451-4.

Yer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999;283: 83–87.

Yu, K And Ornitz, D.M. Uncoupling fibroblast growth factor receptor 2 ligand binding specificity leads to Apert syndrome-like phenotypes. *proc. Natl Acad Sci U.S.A*. 2001;98:3641-3.

Zambrano NZ, Montes GS, Shigihara KM, Sanchez EM, Junqueira LCU. Collagen arrangement in cartilages. *Acta Anat*. 1982;113:26-38.

Zhang Z, Li XJ, Liu Y, Zhang X, Li YY, Xu WS. Recombinant human decorin inhibits cell proliferation and downregulates tgfbeta1 production in hypertrophic scar fibroblasts. *Burns*. 2007;33(5):634-41. Epub 2007 Mar 19.

ANEXO

ANEXO

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

Ofício nº 020/2006-UEP-CEP

Bauru, 03 de março de 2006.

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado *“Caracterização histológica e imunoistoquímica da mucosa de palato duro em pacientes portadores de Síndrome de Apert.”*, de autoria de **SILVIA HELENA PEREIRA VERGILI SGARBOSA** desenvolvido sob sua co-orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sª a gentileza de comunicar o parecer à pesquisadora.

A pesquisadora fica responsável pela entrega na Unidade de Ensino e Pesquisa dos relatórios semestrais, bem como comunicar ao CEP todas as alterações que possam ocorrer no projeto.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação.

Atenciosamente

PROF. DR. ALCEU SÉRGIO TRINDADE JÚNIOR

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP

Ilma. Sra.

Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

Periodontia – HRAC/USP

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
Seção de Apoio à Pesquisa

Ofício nº 293/2008-SVAPEPE-CEP

Bauru, 02 de outubro de 2008.

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa intitulado “*Caracterização histológica e imunoistoquímica da mucosa de palato duro em pacientes portadores de Síndrome de Apert.*”, de autoria de V.S^a, foi aprovado pelo CEP em 22 de fevereiro de 2008. Na reunião realizada em **24/09/2008** a solicitação de alteração no título para: “*Análise histológica, histoquímica e imunohistoquímica da mucosa de palato duro em pacientes portadores de síndrome de Apert.*”, foi aprovada.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará um parecer final que poderá ser utilizado para publicação.

Atenciosamente

PROFA. DRA. IZABEL MARIA MARCHI DE CARVALHO

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)

SILVIA HELENA PEREIRA VERGILI SGARBOSA

A/C

Dra. Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

Periodontia – HRAC/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421
E-mail: cep@centrinho.usp.br