CRISTIANE CABRAL COSTA

Efeito do Hormônio Tireoideano e do seu Antagonista NH3 na Diferenciação Osteoblástica de Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras de Mutação no FGFR2 Determinante da Síndrome de Apert

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

CRISTIANE CABRAL COSTA

Efeito do Hormônio Tireoideano e do seu Antagonista NH3 na Diferenciação Osteoblástica de Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras de Mutação no FGFR2 Determinante da Síndrome de Apert

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Costa, Cristiane Cabral.
Efeito do hormônio tireoideano e do seu antagonista NH3 na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas portadoras de mutação no FGFR2 determinante da Síndrome de Apert / Cristiane Cabral Costa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudo do papel do hormonio tireoideano na regulação do desenvolvimento ósseo.

Versão do título para o inglês: Effect of thyroid hormone and its antagonist NH3 on osteoblastic differentiation of human periosteal mesenchymal cells with FGFR2 mutation that causes Apert Syndrome.

1. Hormonio tireoideano 2. Diferenciação osteoblástica 3. Síndrome de Apert 4. Mutação P253R 5. Antagonista do T3 6. NH3
I. Ferreira, Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB053/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristiane Cabral Costa.

Título da Tese: Efeito do hormônio tireoideano e do seu antagonista NH3 na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas portadoras de mutação no FGFR2 determinante da Síndrome de Apert.

Orientador(a): Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 27 de outubro de 2009.

PARECER 920 /CEP

A *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, na sessão de 23.10.2009 **APROVOU** o projeto intitulado: "*Efeito do hormônio tireoideano e do seu antagonista nh3 na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W NO FGFR2*", com atenção se essa coleção de tecidos está devidamente cadastrada segundo a Resolução 347/05, sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **Cecília Helena de A. Gouveia Ferreira**, Profa. Dra. **Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno** Co-orientadora e a aluna **Cristiane Cabral Costa**,

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **23.10.2010**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que ilumina e guia todos meus passos.

À Profa. Cecília Gouveia, pela orientação, pelos ensinamentos profissionais e pessoais e por me dar a chance de adquirir todo o conhecimento ao longo desses anos.

À Profa. Maria Rita, por co-orientar este trabalho, por contribuir com seu vasto conhecimento e por abrir as portas de seu laboratório, inserindo grandes oportunidades em meus estudos.

Ao meu marido Matheus Vilela, pelos incentivos profissionais, por acreditar, até mais do que eu mesma, em minhas capacidades. Por não me deixar desistir nos inúmeros momentos de desespero. Por entender os vários períodos em que me ausentei pela dedicação realmente exclusiva à pesquisa. Sua presença, seu amor, seu exemplo e sua força foram essenciais nesta etapa de minha vida.

À minha mãe (*in memorian*), que faz parte de minha formação pessoal e profissional com seu exemplo de vida e com todos seus ensinamentos que ficaram. Ao meu pai, grande incentivador de meus sonhos, independente do tamanho deles. Seu amor, seu exemplo, suas conversas, sua sabedoria, sua presença, são e sempre serão essenciais em minha vida.

À Edilene, pelo apoio, pelas conversas e experiências compartilhadas.

À minha irmã Patrícia, por sua ajuda nos momentos felizes ou não tão felizes, por seu exemplo de dedicação e amor à profissão, exemplo como pessoa e por tornar os anos da pós-graduação um pouco mais leves e divertidos com a presença dos meus sobrinhos Anna Beatriz e Miguel. Aos meus irmãos, Débora e João Victor, por dividir apartamento, alegrias, tristezas, jantares, dúvidas, conquistas. Pelas conversas, pelos conselhos, pela paciência, por entenderem todos os momentos vividos por um pós-graduando.

Aos amigos do laboratório Gisele Martins, Marcos Vinícius da Silva, Marília Teixeira e Bruno de Melo, pelos momentos científicos e de descontração, pelas viagens, congressos, momentos todos divididos sempre com muita alegria. À Manuela

Miranda, pelo auxílio nos experimentos e pela confiança na orientação inicial na sua vida de laboratório. Obrigada por toda ajuda de vocês.

À Fatima Freitas, pela sua amizade, compreensão, conversas, conselhos, palpites científicos e presença em minha vida. Sua contribuição com certeza me faz ver a vida científica com outros olhos.

Às técnicas do laboratório da Profa. Maria Rita: Meire Aguena, Larissa Bomilcar e Simone Ferreira, sempre solícitas nos meus momentos de dúvidas.

Aos alunos da Profa. Maria Rita: Rodrigo Atique, Felipe Ishiy, Erika Yeh, pela ajuda com as técnicas laboratoriais. Ao Roberto Fanganiello, por todos ensinamentos.

Ao Dr. Cássio Eduardo Raposo do Amaral, por me dar a chance valiosa de conhecer e aprender mais sobre a Síndrome estudada, especialmente na área hospitalar e clínica dos pacientes. Meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos de outros laboratórios, de outros institutos e universidades: Tábata Leal, Cristina Fürstenau, Maria Alícia Sepúlveda, Cristina Matoso, Kelly Palombit, Aline Bobna, Kátia Viegas, Gabriele Mattos, Michele Susin, quero agradecer pelas conversas, risadas, apoio, pelas experiências de vida e científicas divididas. Cristiane Polo e Alessandra Galhardo, nossos cafés e jantares filosóficos foram engrandecedores. Mônica França e Tatiana Fonseca, obrigada por toda ajuda com seus conhecimentos científicos tão bem compartilhados e pela amizade.

Aos professores, Claudimara Ferini Paccico Lotfi, Elen Haruka Miyabara e Maria Luiza Morais Barreto de Chaves por disponibilizarem seus laboratórios para a realização de alguns experimentos. Ao professor Esem, pela amizade e pelos incentivos nos momentos de desânimo. Ao Prof. Rafael Diniz Mascarenhas Dalle, professor da graduação, um grande amigo e mentor.

Aos funcionários do ICB III, especialmente à Patrícia R. C. Rocha, por toda ajuda.

Aos amigos e familiares que torceram em cada passo, em cada obstáculo, em cada conquista. Especialmente à tia Nilce e família, Rosa Cabral, Ana Paula Ribeiro, Camilla Zeidler, Graziela Iatchuk, Éricka Faria, Jussara Zaragueta, Júlia Ávila, Daniela Franco, Sophia Vieira, Adriana Dias. Obrigada pelo apoio incondicional.

À Fapesp, pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Costa CC. Efeito do hormônio tireoideano e do seu antagonista NH3 na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas portadoras de mutação no FGFR2 determinante da Síndrome de Apert [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2014.

Evidências sugerem que há interação entre o hormônio tireoideano (HT) e os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) no desenvolvimento esquelético, entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que determinam esse intercâmbio. A Síndrome de Apert (SA) é uma mutação do tipo ganho de função, caracterizada por aumento da afinidade do FGFR2 por FGFs, e por uma sinalização anormal que segue a interação FGF/FGFR2. Consequências dessa mutação incluem o aumento da osteogênese, levando a craniossinostose grave (fusão prematura dos ossos do crânio) e outras anormalidades esqueléticas. No presente estudo, investigamos a interação do HT com os FGFs, utilizando células mesenquimais periósticas humanas da sutura coronal de pacientes com SA (mutação P253R) e de pacientes sem doença óssea (normais). As células foram tratadas com triiodotironina (T3) e/ou com um antagonista do T3, o NH3, em doses equimolares (10^{-8} M). Em relação as células controle (células normais ou mutadas sem tratamento), o T3, NH3 ou T3+NH3 não alteraram o crescimento nem a viabilidade de células normais, mas o T3 aumentou o número de células com a mutação P253R, enquanto o NH3 bloqueou este efeito do T3. Em ensaios de diferenciação celular, no dia 9, vimos que a atividade da fosfatase alcalina (ALP) estava aumentada nas células P253R em comparação às células normais. Em células normais, o T3, NH3 e T3+NH3 estimularam a atividade da ALP, mas o T3+NH3 resultou numa indução da ALP menor do que aquela promovida pelo T3 sozinho. Nas células portadoras da mutação P253R, o T3 e/ou NH3 não alterou a atividade da ALP. Observou-se, também, um aumento na expressão gênica do RUNX2 e do FGFR2 e uma diminuição na expressão gênica da osteocalcina em células com a mutação P253R. Houve uma maior formação de nódulos de mineralização nas células mutadas, desde o 6º até o 21º dia de diferenciação osteoblástica. O T3 estimulou a formação de nódulos de mineralização (dia 21), enquanto que o NH3 bloqueou completamente este efeito do T3 nas células normais. Corroborando esses achados, o T3 induziu a expressão do mRNA do RUNX2 nas células normais, enquanto o NH3 bloqueou este efeito. Já nas células portadoras da mutação P253R, o T3 não alterou a formação de nódulos de mineralização, mas o NH3 e o T3+NH3 reduziram a formação dos nódulos. Podemos concluir que as células do periósteo normal e portador da mutação P253R são responsivas ao T3 e ao NH3. Nas células normais, o NH3 foi capaz de bloquear a ação do T3 e, nas células mutadas, inibiu a diferenciação osteoblástica exacerbada. Por outro lado, o T3 não foi capaz de alterar a diferenciação osteoblástica nas células mutadas. Esses achados sugerem que o T3 e FGFR2 possam ter vias ou mecanismos de ação comuns na regulação da diferenciação osteblástica, e que antagonistas ou agonistas do T3 possam ser utilizados como ferramentas farmacológicas no tratamento de doenças relacionadas à ossificação anormal.

Palavras-chave: Síndrome de Apert. Mutação P253R. Diferenciação osteoblástica. Hormônio Tireoideano. Antagonista do T3. NH3.

ABSTRACT

Costa CC. Effect of thyroid hormone and its antagonist NH3 in osteoblastic differentiation of human periosteal mesenchymal cells with mutation in FGFR2 that cause Apert Syndrome. [Thesis (Doctorate in Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2014.

Evidences suggest that there is an interaction between the thyroid hormone (TH) and fibroblast growth factors (FGFs) in the skeletal development. However, the knowledge regarding the molecular mechanisms that determine this relation is poorly understood. Apert Syndrome (AS) is a gain-of-funcion mutation characterized by increased osteogenesis, leading to severe craniosynostosis (premature fusion of skull bones) and other skeletal abnormalities. We investigate the interaction of TH with FGFR using human periosteal mesenchymal cells of the coronal suture in patients with AS (P253R mutation) and patients without bone disease (normal). Cells were treated with triiodothyronine (T3) and/or with a T3 antagonist, NH3, in equimolar doses (10^{-8} M). Compared to control cells (normal or mutated untreated cells), T3 or T3+NH3 did not affect the growth or viability of normal cells, but T3 increased the number of mutaded cells, while NH3 blocked this T3 effect. In studies of cell differentiation, we found that the activity of alkaline phosphatase (ALP) 9 was increased in P253R cells, compared to normal cells, on day 9. The treatment with T3, NH3 and T3+NH3 stimulated ALP activity in normal cells, but T3+NH3 resulted in induction of ALP lower than that promoted by T3 alone. In cells carrying P253R mutation, T3 and/or NH3 did not affect the activity of ALP. We also observed an increase in mRNA expression of RUNX2 and FGFR2 and a decrease in mRNA expression of osteocalcin in cells with P253R mutation. There was a larger formation of mineralization nodules in mutated cells from 6th through 21st day of osteoblastic differentiation. Treatment with T3 stimulated the formation of mineralization nodules (day 21), while NH3 completely blocked this effect of T3 on normal cells. In agreement with these findings, T3 induced RUNX2 mRNA expression in normal cells, while NH3 blocked this effect. In respect to the P253R mutated cells, T3 did not alter the formation of mineralization nodules, but NH3 and T3+NH3 did reduce this formation. We conclude that both normal and P253R mutated periosteum cells are responsive to T3 and NH3. In normal cells, NH3 was able to block the action of T3 and, in mutated cells, NH3 inhibit exacerbated osteoblastic differentiation. Furthermore, T3 was not able to change the osteoblastic differentiation in P253R mutated cells. These findings suggests that T3 and FGFR2 may have common signaling pathways and/or mechanisms of action in the regulation of osteoblastic differentiation, and that T3 antagonists or agonists may be used as pharmacological tools in the treatment of diseases related to abnormal ossification.

Keywords: Apert Syndrome. P253R Mutation. Osteoblastic differentiation. Thyroid Hormone. T3 Antagonist. NH3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ossos e suturas do crânio.....22

Figura 2. Características estruturais dos receptores de fatores de crescimento fibroblásticos (FGFRs).....25

Figura 3. Detalhes da sutura de um paciente com Síndrome de Apert.....37

Figura 4. Periósteo sendo preparado para cultura primária.....38

Figura 5. Cultura primária do periósteo.....39

Figura 6. Análise de diferentes concentrações celulares ($5x10^3$; $10x10^3$, $15x10^3$ células/poço) em relação ao crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W.....46

Figura 7. Análise de diferentes concentrações celulares ($4x10^4$ e $8x10^4$ células/poço) em relação ao crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W.....47

Figura 8. Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8} M) no crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação P253R.....48

Figura 9. Efeito da concentração de soro fetal bovino (0.5%, 1%, 2%, MC ou MST) no crescimento celular de células mesenquimais periósticas normais.....50

Figura 10. Crescimento das células mesenquimais periósticas humanas normais e das células portadoras da mutação P253R.....51

Figura 11. Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8} M) no crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas normais e portadoras da mutação P253R.....52

Figura 12. Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8} M) na viabilidade de células mesenquimais periósticas humanas normais e portadoras da mutação P253R.....53

Figura 13. Formação de nódulos de mineralização em células mesenquimais periósticas humanas normais e portadoras da mutação P253R.....54

Figura 14. Comparação da expressão do mRNA do gene RUNX2 entre células normais e células com a mutação P253R.....55

Figura 15. Comparação da expressão do mRNA do gene osteocalcina (BGLAP) entre células normais e células com a mutação P253R.....55

Figura 16. Comparação da expressão do mRNA do gene FGFR2 entre células normais e células com a mutação P253R.....56

Figura 17. Efeito de doses crescentes de T3 ou NH3 (10^{-8} M) no período de diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas normais e portadoras da mutação P253R.....57

Figura 18. Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8} M) na atividade da fosfatase alcalina em células mesenquimais periósticas humanas normais e portadoras da mutação P253R.....58

Figura 19. Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8} M) na formação de nódulos de mineralização em células mesenquimais periósticas humanas normais e portadoras da mutação P253R.....60

Figura 20. Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8} M) na expressão do mRNA do gene RUNX2 de células mesenquimais periósticas humanas normais.....61

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Primers utilizados para PCR Real Time quantitativo.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-1 2 AF-2 – *Activation function* 1 e 2

ALP – Fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase*)

ANOVA – Análise de variância

BGLAP (*bone gla protein*)

cDNA – DNA complementar (*complementar deoxyribonucleic acid*)

Col I – Colágeno I

DMEM – *Dulbecco's modified Eagles's medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

D1,D2,D3 – Desiodases das iodotironinas do tipo I, II e III

EPM – Erro padrão da média

FBS – Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FGF – Fator de crescimento fibroblástico (*Fibroblastic Growth Factor*)

FGF1-FGFR4 – Receptor do fator de crescimento fibroblástico 1 a 4

FRS2 – *lipid-anchored FGFR substrate-2*

GAPDH– *Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase*

GC-1 – Agonista do hormônio tireoideano seletivo pelo TRβ

GH – Hormônio do crescimento (*Growth Hormone*)

HSPG – Proteoglicanos de heparan sulfato (*Heparan Sulfate Proteoglycans*)

HT – Hormônio tireoideano

JAK-STAT – *Janus Kinase/Signal Transducers and activators of transcription*

MAPK – Via da *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MC – Meio de crescimento

MCT8 – *Monocarboxylated Transporter* 8

MO – Meio de diferenciação osteogênica

mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro (*Messenger ribonucleic acid*)

MT – Meio de tratamento

MTr – Meio de transporte

NH3 – Antagonista do hormônio tireoideano

N-CoR – *Nuclear Receptor Corepressor*

OC – Osteocalcina

OP – Osteopontina

PBS – Phosphate buffered saline

PCR – Reação em cadeia da polymerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PI3K/Akt – Fosfatidilinositol 3-kinases (*Phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B*)

PLCɣ – Fosfolipase C gama (*Phospholipase C-gamma*)

RUNX2 – *Runt-related transcription factor 2*

SA – Síndrome de Apert

SOBRAPAR – Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Craniofacial

T3 – 3,5,3'-triiodotironina

T4 – 3,5,3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina

TR – Receptor do hormônio tireoideano (*Thyroid Receptor*)

TRE – Elemento responsivo do hormônio tireoideano (*Thyroid hormone responsive element*)

TSH – Hormônio Tireoestimulante (*Thyroid stimulating hormone*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 20

1.1 Os ossos do Crânio e as Suturas..... 21

1.2 Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGFs) e seus Receptores (FGFRs)..... 24

1.3 A Síndrome de Apert..... 26

1.4 O Hormônio Tireoideano (HT) e o Esqueleto..... 29

1.5 O Uso de Análogos do HT para o Estudo das Ações do HT no Esqueleto..... 31

1.6 A Interação do HT e FGFs no Esqueleto..... 32

2 OBJETIVOS..... 34

3 SIGNIFICÂNCIA DO ESTUDO..... 35

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 36

4.1 Amostras..... 36

4.2 Estabelecimento das Culturas Celulares..... 37

4.3 Avaliação do Efeito do T3 e NH3 no Crescimento e Viabilidade Celulares..... 39

4.4 Avaliação do Efeito do T3 e NH3 na Diferenciação Osteoblástica..... 41

4.4.1 Curva dose-resposta de T3 ou NH3..... 41

4.4.2 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina..... 42

4.4.3 Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização..... 42

4.4.4 Avaliação da Expressão de Genes Marcadores da Diferenciação Osteoblástica..... 43

4.5 PCR em Tempo-Real..... 43

4.6 Análise Estatística..... 44

5 RESULTADOS..... 46

5.1 Efeito do T3 e NH3 no Crescimento das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação S252W..... 46

5.2 Efeito do T3 e NH3 no Crescimento das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R..... 47

5.3 Crescimento das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais..... 50

5.4 Efeito do T3 e NH3 no Crescimento e Viabilidade das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais..... 51

5.5 Diferenciação das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais..... 53

5.6 Efeito do T3 e NH3 na Diferenciação das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais..... 56

5.6.1 Curva dose-resposta de T3 ou NH3..... 56

5.6.2 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina..... 57

5.6.3 Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização..... 59

5.6.4 Avaliação da Expressão de Gene Marcador da Diferenciação Osteoblástica..... 61

6 DISCUSSÃO..... 62

7 CONCLUSÃO..... 73

REFERÊNCIAS..... 74

1 INTRODUÇÃO

Uma complexa interação de moléculas de sinalização e fatores de transcrição que direcionam o destino, proliferação e diferenciação celular, é necessária para que ocorra o desenvolvimento e manutenção dos tecidos e órgãos. Mais especificamente quanto aos elementos esqueléticos, a diferenciação de células mesenquimais multipotentes em osteoblastos e condrócitos é orquestrada por uma rede complexa de moléculas de sinalização, sendo que, tanto o hormônio tireoideano (HT) quanto os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF - *fibroblast growth factor*) têm papéis importantes nesse processo.

Evidências recentes indicam interações complexas entre o HT e FGFs na angiogênese e na regulação da proliferação e/ou diferenciação celular do sistema nervoso central, coração e esqueleto (Williams et al., 2007). Embora haja evidências convincentes de que há uma ampla interação entre o HT e os FGFs no desenvolvimento dos tecidos, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que determinam esse intercâmbio.

Este trabalho tem como objetivo investigar a interação do HT com os FGFs no crescimento celular e na diferenciação osteoblástica, utilizando como modelo células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W ou P253R no receptor tipo 2 de FGF (FGFR2). Essas são mutações do tipo ganho de função e se caracterizam por aumento da afinidade do FGFR2 pela maior parte dos FGFs, por uma perda de especificidade pelos FGFs e por uma sinalização anormal que segue a interação FGF/FGFR2 (Ibrahimi et al., 2004; Wilkie et al., 1995). Essas alterações afetam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e condrócitos, levando à fusão prematura dos ossos do crânio (craniossinostose) e outras anormalidades esqueléticas que caracterizam a Síndrome de Apert.

A investigação da interação do HT com a via dos FGFs em células portadoras das mutações que levam à Síndrome de Apert poderá contribuir para a identificação de novos alvos farmacológicos para a manipulação da proliferação e diferenciação celular. Especificamente quanto ao esqueleto, esse conhecimento poderá ser utilizado no tratamento de doenças do desenvolvimento esquelético, como as craniossinostoses, bem como no tratamento da osteoporose e no reparo de fraturas ósseas.

1.1 Os Ossos do Crânio e as Suturas

O crânio de mamíferos é uma estrutura complexa que pode ser dividida em víscero-crânio, ou esqueleto facial, e neuro-crânio, formado pela base do crânio e a calota craniana (abóbada ou calvária) (Wilkie, Morriss-Kay, 2001).

Em grande parte do esqueleto facial e na calota craniana, a osteogênese ocorre por um processo denominado ossificação intramembranosa, onde os osteoblastos diferenciam-se diretamente de condensações mesenquimais (Ornitz, Marie, 2002). Esses ossos são unidos por meio de suturas cranianas, que são articulações fibrosas, dentro das quais a proliferação de osteoblastos ao longo das bordas dos ossos impulsiona a sua expansão, enquanto um mesênquima interveniente de sutura não-ossificante mantém a sua separação (Holmes, Basílico, 2012; Morris-Kay, Wilkie, 2005).

As suturas apresentam várias funções: (a) determinar o crescimento do crânio; permitindo o crescimento do encéfalo; (b) articular os ossos do crânio; (c) servir como um coxim para absorver choques; e (d) permitir a passagem do crânio através do estreito canal do parto, por um processo combinado da sobreposição sutural e deformação do osso parietal (Jaslow, 1990; Ornitz, Marie, 2002).

O crânio humano apresenta, aproximadamente, 25 suturas, sendo que, os pares de ossos cranianos frontais e parietais são separados na linha média pelas suturas metópica e sagital, respectivamente; os ossos frontais são separados dos ossos parietais pela sutura coronal; os ossos parietais são separados do osso occipital pela sutura lambdóide e os ossos parietais são separados dos temporais pela sutura escamosa (Johnson, Wilkie, 2010; Opperman, 2000) (Fig. 1).

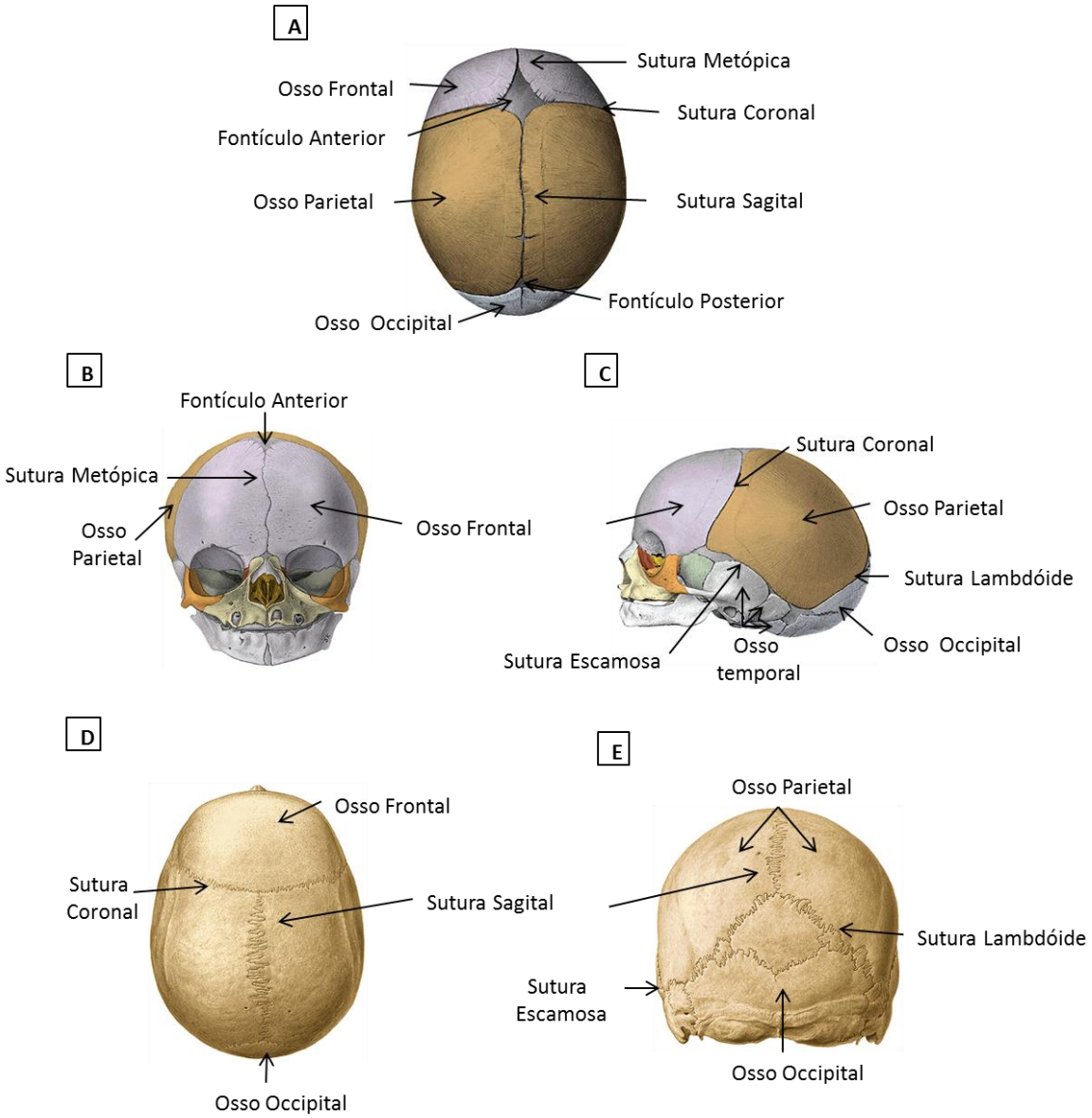

Figura 1: Ossos e suturas do crânio. Vista **(A)** Superior, **(B)** Anterior e **(C)** Lateral do crânio de um recém-nascido, e Vista **(D)** superior e **(E)** Posterior de um crânio de um adulto [Sobotta, 1993].

Os mecanismos moleculares que controlam a formação das suturas são pouco compreendidos. A substituição prematura das suturas por tecido ósseo, levando à fusão entre os ossos adjacentes, é denominada craniossinostose. Esta pode ser acompanhada por outras malformações ou não ter malformações

associadas, caracterizando condições craniossinostóticas sindrômicas ou não-sindrômicas, respectivamente.

Enquanto a ossificação intramembranosa subperiosteal contribui para o aumento da espessura dos ossos, a forma global da calvária é determinada pela extensão e taxa de formação óssea que ocorre perpendicularmente nas suturas. As suturas cranianas são mais do que articulações ligamentares, as quais unem os ossos da calvária. São, também, os sítios primários de crescimento ósseo (Ogle et al., 2004). Se uma sutura ossifica prematuramente, ocorre distorção da forma da calvária por causa da combinação da falta de crescimento perpendicular da sutura ossificada e do super-crescimento compensatório das suturas normais para acomodar o sistema nervoso em expansão (Johnson, Wilkie, 2010; Ogle et al., 2004).

A craniossinostose causa uma desfiguração craniana e facial e, sem correção, pode resultar numa variedade de problemas que incluem: aumento da pressão intracraniana, prejuízo do desenvolvimento do cérebro e intelectual, cegueira, surdez e retardo mental (Ogle et al., 2004, Warren, Longaker, 2001). A craniossinostose é uma das anormalidades craniofaciais mais comuns causadas por sinalização anormal no mesênquima sutural. Ocorrem com uma prevalência de aproximadamente 1 em 2.100-3.000 nascimentos (Eswarakumar et al., 2006; Hehr, Muenke, 1999) e 20% são causadas por mutações do tipo ganho de função em FGFRs.

Ainda não é claro quais tecidos e fatores de sinalização são responsáveis pela indução da formação da sutura. A dura-máter é permissiva para a formação da sutura, mas um estímulo indutivo desta é requerido durante a formação da sutura antes desta se tornar capaz de manter a si mesma (Opperman et al., 1993; Opperman, 2000).

Uma forma efetiva para entender os mecanismos regulatórios que mantém as suturas e que, portanto, impedem a sua ossificação ao mesmo tempo que permitem que elas funcionem como sítios de crescimento ósseo, é observar os sistemas nos quais esses mecanismos regulatórios são interrompidos. É sabido que mutações em vários receptores de fatores de crescimento e fatores de transcrição estão associados à craniossinostose.

As mutações do tipo ganho de função, como as que acontecem nos genes dos FGFRs resultam em encerramento da sutura associada com uma aceleração da diferenciação celular tanto das frentes osteogênicas quanto dentro da matriz da sutura (Iseki et al., 1997; Lemonnier et al., 2000; Opperman, 2000). A manutenção da sutura depende da regulação de um conjunto de fatores que podem trabalhar dentro de uma mesma via ou independentemente (Opperman, 2000).

1.2 Fatores de Crescimento Fibroblásticos (FGFs) e seus Receptores (FGFRs)

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF – *fibroblast growth factor*) têm papel relevante na biologia humana, uma vez que regulam o desenvolvimento embriológico, homeostase e processos regenerativos, incluindo o desenvolvimento esquelético e a osteogênese pós-natal (Marie, 2003). Os FGFs controlam a formação óssea por regular a expressão de vários genes envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose osteoblástica (Marie, 2003). O desenvolvimento ósseo é dependente da expressão de membros da família dos FGFs expressos localmente durante a formação óssea. No embrião, os FGFs são os maiores reguladores da comunicação mesênquima-epitélio e é requerido para a organogênese (Jodar et al., 1998; Mohammadi et al., 2005). No adulto, os FGFs continuam a regular a homeostase dos tecidos além de terem papel na cicatrização de feridas, no reparo tecidual, no metabolismo do colesterol (Mohammadi et al., 2005; Yu et al., 2000) e na regulação do fosfato sérico (Mohammadi et al., 2005; White et al., 2001).

Já foram identificados 18 FGFs: FGF1 ao FGF10 e FGF16 ao FGF23, os quais são agrupados em 6 subfamílias baseados em diferenças na sequência de homologia e filogenia. Os FGF11-FGF14, que são fatores homólogos aos FGFs, possuem alta identidade de sequência com a família dos FGFs, mas não ativam os receptores FGFRs, e, portanto, não são considerados membros da família FGF (Beenken, Mohammadi, 2009; Olsen et al., 2003). Os FGFs se ligam e ativam 4 tipos de receptores tirosino kinase (Givol, Yayon, 1992; Ornitz, Itoh, 2001), designados como receptores de alta afinidade ao FGF (FGFRs). O gene de cada um dos quatro FGFRs (FGFR1-4) pode sofrer *splicing* alternativo, dando origem a uma série de possíveis isoformas de FGFRs, com afinidades variadas pelos vários FGFs.

A complexidade da sinalização dos FGFRs é ainda maior pelo fato da interação funcional entre FGFs e FGFRs requerer a ligação de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), em um complexo tri-molecular (Liu et al., 1999; Ornitz, 2000, Rapraeger et al., 1991). Os FGFRs consistem de 3 domínios imunoglobulina extracelular (D1-D3), um domínio transmembrana e um domínio tirosino kinase citoplasmático. Uma característica dos FGFRs é a presença de uma sequência acídica, rica em serina no link entre D1 e D2, chamada de caixa ácida. O fragmento extracelular D2-D3 é necessário e suficiente para a ligação e especificidade do ligante, enquanto acredita-se que o domínio D1 e a caixa ácida tenham um papel na autoinibição do receptor (Beenken, Mohammadi, 2009; Wang et al., 1995) (Fig. 2).

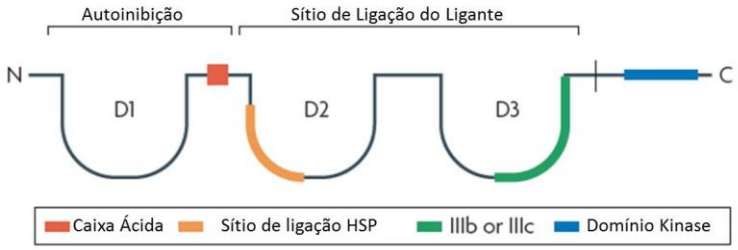

Figura 2: Características estruturais dos receptores de fatores de crescimento fibroblásticos (FGFRs). [Adaptado de Beenken, Mohammadi, 2009].

Os FGFRs utilizam três principais vias de segundos mensageiros: fosfolipase C-γ (PLCγ), STATs e MAPK. A resposta mais freqüente de sinalização intracelular seguida da ativação do FGF é a ativação da via MAPK. Esta ativação é mediada via FRS2 (*lipid-anchored FGFR substrate-2*) que constitutivamente liga-se ao FGFR1 mesmo na falta de FGF. Seguindo a ativação do FGFR (via fosforilação por tirosina), o FRS2 atua como um ponto de montagem para um complexo multiprotéico que controla a cascata da MAPK e a via PI3K/Akt (Lee, McCubrey, 2002). São essas rotas de segundos mensageiros ativadas pelos FGFs que apresentam oportunidades para a interação com as vias de sinalização do HT.

Três FGFRs são essenciais para o desenvolvimento esquelético (De Luca, Baron, 1999; Ornitz, Marie, 2002). O FGFR1 é a principal isoforma expressa em células mesenquimais que originam os membros, e o FGFR2 é expresso durante a

condensação do mesênquima (Ornitz, Marie, 2002). FGFR1 e FGFR2 são expressos nos ossos do crânio em desenvolvimento e regulam a ossificação intramembranosa (De Luca, Baron, 1999; Ornitz, Marie, 2002). O FGFR3 tem expressão predominante em condrócitos proliferativos e hipertróficos da lâmina epifiseal (Lehmke et al., 1992; Ornitz, Marie, 2002). O envolvimento da sinalização de FGFs em doenças humanas é bem documentado. Uma sinalização desregulada pode contribuir para condições patológicas tanto através do ganho quanto da perda de função, seja dos FGFs ou dos seus receptores – FGFRs (Beenken, Mohammadi, 2009). A gravidade das síndromes esqueléticas humanas vindas de mutações que violam, de alguma forma, a ligação FGF/FGFR é a prova da grande importância da manutenção precisa da especificidade entre FGF/FGFRs (Mohammadi et al., 2005). Mutações do FGFR1, FGFR2 e FGFR3 do tipo ganho de função podem alterar a resposta normal da sinalização da ativação do receptor por alterar a ocupação do receptor pelos ligantes e/ou prolongar a duração da sinalização do ligante-receptor, causando síndromes caracterizadas por craniossinostose (Tamburrini et al., 2005; Wilkie, Morris-Kay, 2001), dentre elas a Síndrome de Apert (SA).

1.3 A Síndrome de Apert

A Síndrome de Apert (SA), descrita em 1906, é uma das mais graves síndromes craniossinostóticas, sendo responsável por 4,5% de todos os casos em diferentes populações (Cohen et al., 1992). É uma doença congênita, autossômica dominante, de origem exclusivamente paterna (Wilkie et al., 1995; Goriely et al., 2003), caracterizada por craniossinostose de alta penetrância, hipoplasia do terço médio da face e sindactilia simétrica das mãos e pés, tendo ao menos os dígitos 2, 3 e 4 envolvidos (Cohen, 1975). Anomalias viscerais também podem estar presentes, entre as quais incluem as malformações cardiovasculares (10% dos casos) e genitourinárias (9,6%), além de anomalias no sistema respiratório (1,5%) e gastrointestinal (1,5%) (Cohen, 1975; Cohen et al., 1992).

Wilkie e colaboradores (1995) descobriram duas mutações no FGFR2: a Ser252Trp (S252W) e Pro253Arg (P253R), as quais foram confirmadas por outros autores para a Síndrome de Apert (Lajeunie et al., 1999; Passos-Bueno et al.,1998; Tsai et al., 1998). Além dessas mutações, outras mais raras no FGFR2 também já

foram relatadas (Lajeunie et al., 1999; Passos-Bueno et al., 1997; Oldridge et al., 1999). Sendo que as mutações mais frequentes são a S252W e P253R, acometendo, respectivamente, 67% e 32% dos pacientes portadores (Ibrahimi et al., 2001; Oldridge et al., 1995; Wilkie et al., 1995). Essas mutações são do tipo ganho de função, e estão relacionadas com alterações nas isoformas FGFR2b e FGFR2c. O FGFR2b selvagem se liga a FGF1, 3, 7, 10 e 22; e o FGFR2c selvagem se liga a FGF1, 2, 4, 6, 9, 17, 18, 20 e 23 (Ornitz et al., 1996; Umemori et al., 2004; Xu et al., 2002). O FGFR2c com a mutação S252W, quando comparado à proteína selvagem e ao FGFR2b com a mutação P253R, apresenta aumento de afinidade pela maior parte dos FGFs (Ibrahimi et al., 2004). Ibrahimi et al. (2004) mostraram que ambas mutações aumentam a afinidade de ligação para quase todos FGFs. A mutação S252W, a qual está associada com craniossinostose mais grave, resulta num maior aumento de ligação do FGFR2c para grande parte dos FGFs, comparada à mutação P253R.

Um estudo anterior mostrou que, nas células com a mutação P253R, há um aumento de afinidade aos FGFs e uma promiscuidade do FGFR2, assim como ocorre na S252W (Ibrahimi et al., 2004). Os modelos animais são os mais utilizados nos estudos funcionais das craniossinostoses. Devido à alta e precoce taxa de mortalidade, estudos *in vitro* são essenciais para avaliar as anormalidades causadas pela síndrome. Camundongos portadores da mutação P253R apresentaram anormalidades osteogênicas e condrogênicas, resultando em craniossinostose e atraso do crescimento de ossos longos durante o desenvolvimento. Além do mais, mostraram que a via Erk1/2 pode ter um papel crítico nas deformações destes animais (Yin et al., 2008). Shukla e colaboradores (2007) conseguiram reverter o fenótipo causado pela mutação S252W em camundongos ao inibirem a transcrição do gene mutante com RNA de interferência (RNAi). Eles também foram capazes de reverter o fenótipo ao tratar os camundongos com um inibidor farmacológico da via MEK-ERK (MAPK), o UO126, durante o desenvolvimento embrionário. Poucos estudos tem investigado os efeitos funcionais em células humanas, as quais apresentam algumas diferenças do modelo animal. Mutações do tipo ganho de função no FGFR2 em osteoblastos de calvárias humanas induzem alterações na sinalização do FGF e subseqüentes mudanças na expressão do receptor e no fenótipo osteoblástico (Lemonnier et al., 2000; Lomri et al., 1998), levando a

aumento da expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica como fosfatase alcalina (ALP), colágeno I (ColI), osteopontina (OP), osteocalcina (OC), assim como N-cadherin (Lomri et al., 1998; Marie, 2003). Estudos funcionais com fibroblastos do periósteo de pacientes portadores da mutação S252W mostraram pela primeira vez que o periósteo possa estar envolvido na patofisiologia da SA (Fanganiello et al., 2007). Os fibroblastos com a mutação S252W apresentaram um maior potencial de diferenciação osteogênica e também um perfil de maior expressão de genes relacionados com o comprometimento osteogênico, identificando genes relacionados à SA (Fanganiello et al., 2007). Além disso, através de uma análise por microarray, identificaram que a expressão gênica de vários membros da via de sinalização da MAPK estava alterada nas células portadoras da mutação S252W, o que levanta a hipótese de que esta via possa ter um papel chave na SA (Fanganiello et al., 2007). Considerando-se esses achados, a investigação dessa via torna-se atraente quanto a uma possível participação na interação entre o HT e a via FGF/FGFR na diferenciação osteoblástica. Yeh et al. (2011) também observaram a diferente função adquirida pelos fibroblastos na patologia da SA, visto que essas células apresentam um maior comprometimento osteogênico. E ainda, viram que estas mesmas células aumentam o potencial osteogênico de células-tronco mesenquimais. Além disso, mostraram também um perfil alterado na proliferação, migração e diferenciação tanto de fibroblastos como de células-tronco mesenquimais, com modificação no perfil da expressão de vários genes. Este conjunto de resultados mostra que células do periósteo possam contribuir para a SA, potencial este anteriormente atribuído à dura mater. Um outro estudo de Yeh et al. (2013) mostrou que embora parte do fenótipo causado pela mutação S252W possa ser explicado pela hiperativação de vias moleculares normais relacionadas à ligação FGF/FGFR, como MAPK, PI3K/Akt e JAK-STAT, a ativação do receptor mutante leva também a uma nova circuitaria de sinalização que ativa diferentes redes gênicas regulatórias.

Assim sendo, células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W e P253R são modelos extremamente interessantes para a avaliação de uma possível interação entre o HT e a via FGF/FGFR2 na diferenciação osteoblástica, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de

estratégias terapêuticas que possam atenuar o quadro clínico de pacientes portadores da SA.

1.4 O Hormônio Tireoideano (HT) e o Esqueleto

O HT exerce vários efeitos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo de diversos tecidos, incluindo o tecido ósseo. O HT tem papel crítico na ossificação endocondral e intramembranosa e é essencial para o desenvolvimento esquelético, crescimento longitudinal e para a manutenção da massa e metabolismo ósseos. Durante o desenvolvimento, a deficiência de HT causa atraso na ossificação intramembranosa e endocondral, somando-se a importantes alterações na lâmina epifisial, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas (Allain, McGregor, 1993; Freitas et al., 2005). Por outro lado, a tireotoxicose acelera a formação óssea levando à ossificação prematura da lâmina epifisial e das suturas cranianas, resultando em menor estatura e craniossinostose (Allain, McGregor, 1993; Bassett, Williams 2003; Segni et al., 1999). Em adultos, o HT tem papel importante no metabolismo ósseo e na manutenção da massa óssea. Em situações de excesso de HT, a atividade dos osteoblastos e osteoclastos está aumentada, sendo que a última predomina, favorecendo a reabsorção óssea, balanço negativo do cálcio e perda de massa óssea (Mosekilde et al., 1977).

Há um consenso geral de que as ações do HT são primariamente resultado da sua interação com os seus receptores nucleares (TRs), que se ligam a regiões específicas dos genes alvo, os elementos responsivos do HT (TREs), e modificam a sua expressão. Há quatro isoformas clássicas de TRs: o TRβ1, TRβ2, TRα1 e TRα2. Essa última isoforma não se liga ao T3 e funciona, pelo menos *in vitro*, como um antagonista do TRα1 e TRβ1 (Katz, Lazar, 1993). O TRα1, TRα2 e TRβ1 são expressos nos osteoblastos, osteoclastos e condrócitos (Abu et al., 1997; Williams et al., 1994). A interação do HT com os TRs depende do influxo/efluxo celular de HT, mediados por transportadores de membrana como, por exemplo, o MCT8 (*monocarboxylated transporter* 8). Um estudo do nosso grupo mostrou a expressão desse transportador no tecido ósseo fetal e pós-natal de camundongos e em células osteoblasto-*like* derivadas da calvária de camundongos, o que sugere que possa ser importante para modular os efeitos do HT na diferenciação osteoblástica (Capelo et

al., 2009). A interação HT/TRs é um sistema peculiar, pois o TR permanece ligado ao TRE da região promotora dos genes tanto com a falta quanto com a presença de ligantes. O TR não ligado recruta co-repressores e reprime a transcrição gênica, enquanto que um TR ligado recruta co-ativadores e ativa a transcrição gênica (Yen et al., 2006). A interação HT/TR também depende da ativação/inativação celular de HT por ação de enzimas celulares, as desiodases das iodotironinas do tipo I, II e III (D1, D2 e D3). Considerando-se as ações genômicas do HT, a tiroxina (T4), principal produto secretório da tireóide, basicamente funciona como um pró-hormônio e é convertido à forma ativa, a triiodotironina (T3), por ação da D1 e D2. Por outro lado, a D3 inativa T4 e T3, convertendo-os a reverso T3 e T2, respectivamente. Essas conversões ocorrem na própria tireóide e, principalmente, nos tecidos alvo do HT (Engler, Burger, 1984). Capelo et al. (2008) demonstraram que a D2 apresenta atividade em todo o esqueleto de camundongos adultos, o que sugere que essa enzima seja importante para a fisiologia óssea. Mostraram, ainda, que as três desiodases são expressas no esqueleto de fetos de camundongos e no esqueleto de camundongos jovens, o que chama a atenção para a importância dessas enzimas no desenvolvimento esquelético pré- e pós-natal (Capelo et al., 2008).

Vale ser dito que estudos recentes mostram que o HT também atua através de mecanismos não-genômicos (Bassett et al., 2003; Kavok et al., 2001), sendo que os sítios dessas ações têm sido localizados na membrana plasmática, no citoplasma e em organelas celulares (Bassett et al., 2003; Kavok et al., 2001). As ações não-genômicas do HT têm sido associadas com a regulação de canais de íons, fosforilação oxidativa e transcrição gênica mitocondrial. Além disso, têm-se demonstrado que envolvem a geração de segundos mensageiros intracelulares e a ativação de cascatas de sinalização como, por exemplo, a cascata da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Bassett et al., 2003; Losel, Wehling, 2003). O mecanismo de ação não-genômico do HT demonstra potencial para interação com outras vias-chave de sinalização envolvidas no desenvolvimento esquelético, como, por exemplo, a via dos FGFs.

Embora a importância do HT para o esqueleto seja clara, os seus mecanismos de ação no esqueleto são pouco conhecidos. Sabe-se que o HT pode afetar o esqueleto indiretamente através de outros hormônios como, por exemplo, o hormônio do crescimento (GH) e o hormônio tireoestimulante (TSH) (Chassande et

al., 1997; Katz, Lazar, 1993). Entretanto, uma série de estudos mostra que o HT também tem ações diretas no esqueleto. Estudos do nosso grupo mostraram ações diretas do HT em células osteoblásticas de ratos e camundongos (Beber et al., 2009; Gouveia et al., 2011). Há alguns anos, vimos que o HT estimula a expressão de osteocalcina, um gene relacionado à formação óssea em linhagem celular osteoblasto-*like* (Gouveia et al., 2001). Além do mais, estudos têm demonstrado que o HT inibe a proliferação e estimula a diferenciação osteoblástica (Abu et al., 1997; Milne et al., 1998; Robson et al., 2000). Recentemente, mostramos que o T3 e um análogo desse hormônio seletivo pelo TRβ, o GC-1, inibem a proliferação e estimulam a diferenciação osteoblástica de maneira similar, o que sugere que o TRβ medeia ações diretas do T3 nos osteoblastos (Beber et al., 2009).

1.5. O Uso de Análogos do HT para o Estudo das Ações do HT no Esqueleto

Análogos do HT vem sendo desenvolvidos, incluindo aqueles do grupo do Dr. Thomas S. Scanlan, da *Oregon Health and Science University*, Portland, Oregon, USA. Alguns desses análogos apresentam seletividade pelo TRα ou TRβ e vêm sendo utilizados como importantes ferramentas farmacológicas para a investigação do papel dos TRs em vários sistemas (Baxter et al., 2004; Grover et al., 2004; Manzano et al., 2003; Trost et al., 2000; Villicev et al., 2007). O nosso grupo tem mantido importante colaboração com o grupo do Dr. Scanlan na investigação do papel do TRβ no tecido ósseo e em células osteoblásticas, utilizando o análogo seletivo pelo TRβ, o GC-1, como ferramenta farmacológica, o que, por sua vez, tem gerado resultados bastante interessantes (Beber et al., 2009; Freitas et al., 2003, 2005). O grupo do Dr. Scanlan também desenvolveu o NH3, um antagonista do HT, que inibe a ligação do T3 ao TR, além de inibir o recrutamento de co-fatores que ativam a transcrição gênica induzida pela interação T3/TR/TRE (Arnold et al., 2005; Grover et al., 2007; Nguyen et al., 2005). Estudos funcionais mostraram que o NH3 é capaz de antagonizar ações conhecidas do T3, como, por exemplo, ações no metabolismo dos lipídeos e no coração (Grover et al., 2007).

No presente estudo, o NH3 será utilizado na investigação de interações entre o HT e a via do FGF. Considerando-se que não há evidências de que o NH3 atue através de via não genômica, a utilização deste antagonista poderá contribuir para a

discriminação de ações genômicas do T3 na via do FGF. Mais importante ainda, nossos achados poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças do desenvolvimento esquelético relacionadas à alteração da sinalização do HT e FGF.

1.6. A interação do HT e FGFs no Esqueleto

Estudos recentes mostram interação do HT com a via de sinalização FGFs/FGFRs em osteoblastos, condrócitos e na lâmina epifiseal, o que sugere importantes intercâmbios entre esses dois sistemas no desenvolvimento do esqueleto (Bassett et al., 2006; Stevens et al., 2003). Barnard et al. (2005) mostraram que o FGFR3 é um gene responsivo ao T3 nas células condrogênicas ATDC5. Além disso, nessas células, o T3 aumentou a ativação da MAPK pelo FGF2 e FGF18, mas inibiu a ativação por FGF do STAT-1. Há evidências, ainda, de que o HT possa regular a ação do FGF no esqueleto através de ações na matriz extracelular. Basset et al. (2006) estudaram a expressão de HSPG em camundongos Pax8$^{-/-}$, que são congenitamente hipotireoideos pela falta de um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento das células foliculares tireoideanas (responsáveis pela síntese de HT) e em camundongos que não expressam nenhum TR (camundongos TR$\alpha^{0/0}$/TR$\beta^{-/-}$). A análise da lâmina epifiseal desses animais, que apresenta atraso na ossificação endocondral, demonstrou que a expressão e distribuição dos HSPGs são reguladas pelo HT. Além disso, foi demonstrado que o T3 inibe a expressão da Gpc6 (a proteína central do HSPG), Ext1 (enzima da síntese do HSPG) e Hs6st2 (enzima modificadora do HSPG) (Bassett et al., 2006). Assim sendo, o HT regula a organização espacial, expressão e estrutura dos HSPGs na matriz da lâmina epifiseal durante a condrogênese. Esses dados sugerem que o TH regula o desenvolvimento esquelético atuando através de um importante componente da via de sinalização do FGFR3, um regulador chave da diferenciação dos condrócitos durante a ossificação endocondral e do crescimento longitudinal ósseo.

Em células osteoblásticas e em culturas primárias de células osteoblásticas da calvária de ratos e camundongos, Stevens et al. (2003) mostraram que o T3 estimula a expressão de FGFR1. Além disso, mostraram que o T3 aumenta a

ativação do FGFR1 estimulado pelo FGF2 através de um mecanismo que envolve MAPK. Ainda, a análise de camundongos com *knockout* do TRα (TR$\alpha^{0/0}$) revelou redução da expressão esquelética de FGFR1. Mostrou-se, ainda, incapacidade do T3 de estimular a expressão do RNAm do FGFR1 ou de aumentar a atividade da MAPK induzida pelo FGF em osteoblastos provenientes de camundongos TR$\alpha^{0/0}$ (Stevens et al., 2003), o que demonstra que o T3 aumenta a ativação da MAPK dependente da interação FGF2-FGFR1 em osteoblastos via mecanismos genômicos que requerem TRα. Além disso, foi demonstrado que a expressão óssea de FGFR1, mas não de FGFR2, se correlaciona com o *status* tireoideano. Esses achados demonstram que ações do T3 no desenvolvimento esquelético dependem da sinalização do FGFR1. Por outro lado, levantam a hipótese de que outros FGFRs, incluindo o FGFR2 e FGFR3, possam mediar as ações do T3 no esqueleto.

Em conjunto, esses estudos sugerem fortemente que há interações entre a via de sinalização FGF/FGFR e o HT no desenvolvimento e metabolismo ósseos. Considerando-se o exposto, algumas questões podem ser levantadas: (i) Será que, nas células com a mutação S252W ou P253R, o HT e o seu antagonista NH3 são capazes de alterar o crescimento celular? (ii) Será que, nessas células, o HT e o seu antagonista NH3 são capazes de, respectivamente, ativar ainda mais ou inibir a diferenciação osteoblástica? (iii) Será que, nessas células, há interação entre o HT e a via dos FGFs na regulação do crescimento e diferenciação osteoblástica?

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é o de avaliar a interação do HT com a via FGF/FGFR no desenvolvimento ósseo através da análise do efeito do T3 e do seu antagonista NH3 na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W e P253R no FGFR2.

Utilizando-se células mesenquimais periósticas humanas derivadas de pacientes portadores da Síndrome de Apert e de pacientes sem evidência de doença óssea (normais), os objetivos específicos deste estudo são o de estudar:

1. O efeito do T3 e NH3 no ciclo de crescimento e viabilidade celular,
2. O efeito do T3 e NH3 na diferenciação osteoblástica, através da avaliação da formação de nódulos de mineralização e da expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica.

3 SIGNIFICÂNCIA DO ESTUDO

A identificação de novos fatores/moléculas que interajam com a via FGF/FGFR na diferenciação osteoblástica poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam desacelerar o processo de ossificação em função de mutações do tipo ganho de função do FGFR2, incluindo as mutações S252W e P253R. Pacientes portadores da SA, por exemplo, são submetidos a diversas cirurgias no crânio desde o nascimento até atingirem a idade adulta, para permitir o crescimento do encéfalo. As técnicas cirúrgicas trazem muitos benefícios, mas como todo procedimento invasivo, consistem de procedimentos complexos, de alto custo e risco de intercorrências aos pacientes. O desenvolvimento de tratamentos paliativos que possam contribuir para a diminuição das cirurgias ou então, garantir um melhor prognóstico aos pacientes, é de grande valia. A regulação do crescimento celular e diferenciação osteogênica oferece grandes possibilidades nesse sentido. Assim, verificar se o HT favorece a ativação osteogênica sobre células portadoras da mutação P253R e analisar se a utilização de um antagonista (NH3) dos TRs pode impedir esta ativação poderá contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos para a craniossinostose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Células mesenquimais foram obtidas a partir do periósteo adjacente à sutura coronal de pacientes portadores da SA e de pacientes que não apresentam evidência de doença óssea, os quais foram chamados de “normais” neste trabalho (Fig. 3). O periósteo dos pacientes portadores da SA e dos normais foi cuidadosamente dissecado durante cirurgia corretiva e durante cirurgia para remoção de tumores cerebrais, respectivamente. Esse material biológico é normalmente descartado durante as cirurgias citadas, sendo, portanto, colhido sem nenhum transtorno aos pacientes. A obtenção desse material ocorre através de colaboração do grupo da Profa. Passos-Bueno, com Dr. Cassio E. R. do Amaral, do Hospital SOBRAPAR (Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Craniofacial) de Campinas; Dr. Sérgio Cavalheiro, do Departamento de Neurologia da Escola Paulista de Medicina; Dr. Nivaldo Alonso, do Departamento de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da USP; e Dr. Renato Freitas do Centro de Atendimento Integral ao Fissurado de Curitiba, PR. Todo o procedimento ocorre com o consentimento dos pacientes ou dos seus responsáveis legais e tem aprovação do Comitê de Ética dos respectivos grupos colaboradores. Para os experimentos, utilizamos culturas de 1 paciente com SA e 1 normal, sendo que os mesmos foram realizados em triplicatas.

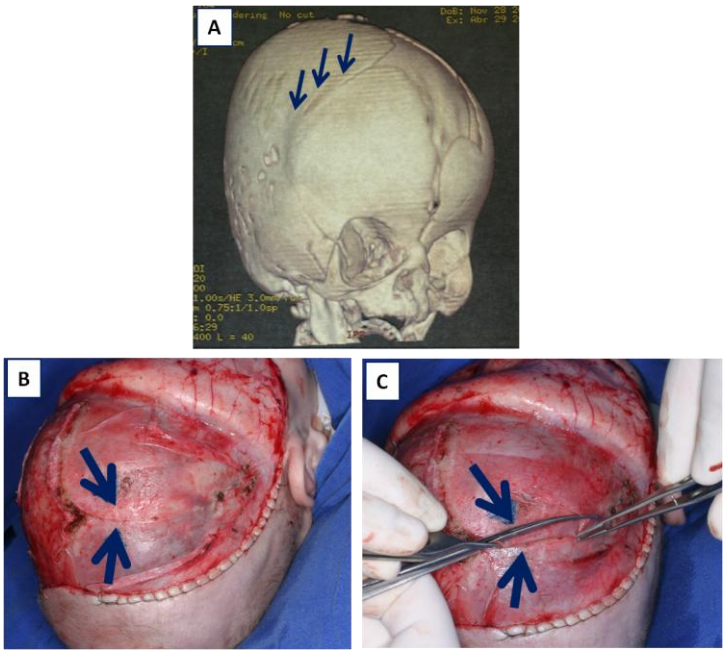

Figura 3: Detalhes da sutura de um paciente com Síndrome de Apert. **(A)** Tomografia Computadorizada evidenciando a fusão da sutura coronal (setas), deformidade do crânio, fontanela abaulada e proeminente sugerindo hipertensão craniana. **(B)** Imagens da sutura coronal fundida (setas). **(C)** Imagens do periósteo sendo retirado, na região da sutura (setas). Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Cassio E. Raposo do Amaral – SOBRAPAR – Campinas.

4.2 Estabelecimento das Culturas Celulares

Após a extração das células mesenquimais, as amostras de periósteo foram lavadas várias vezes com soro fisiológico acrescido de 4% de antibiótico [penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 μg/mL), ambos da Gibco], à temperatura ambiente, e armazenadas em meio de transporte (MTr) contendo Ham's F12, 12% FBS (Soro Fetal Bovino), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL) por até 24 horas, a 4 °C. Os fragmentos foram, então, lavados três vezes com soro fisiológico acrescido de 4% de antibiótico, transferidos para uma placa de Petri de 100 mm contendo MTr, cortados em fragmentos de 1-3 mm (Fig. 4), transferidos para um tubo contendo uma solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, EDTA 1 mM) e incubados por 30-40 min a 37 °C. Foram adicionados 2 volumes e meio de MTr para inativar a tripsina, e o tubo foi centrifugado por 5 min a 1500 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os fragmentos transferidos para

placas de 6 ou 12 poços (1 ou 2 fragmentos por poço), contendo meio de crescimento [MC = DMEM F-12, 15% FBS e 2 mmol/L de glutamina/penicilina/estreptomicina (todos da Gibco, Invitrogen Corp.], trocado a cada dois dias, em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Quando as células atingiram uma confluência de aproximadamente 80% (a cada 5 - 10 dias), foram lavadas em PBS e dissociadas em solução de tripsina-EDTA e replaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm^2 (Fig. 5) Este procedimento foi repetido por três a quatro vezes e, a cada passagem, as células foram congeladas. Para o congelamento, as células foram ressuspendidas em meio contendo 90% de soro fetal bovino, e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – LGC); em uma concentração de 5,0 x 10^5 células/mL. Nos experimentos, foram utilizadas células da passagem 5 a 8.

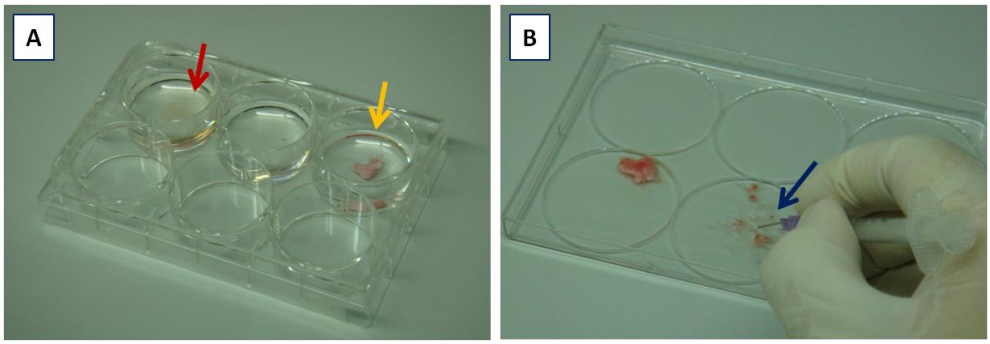

Figura 4: Periósteo sendo preparado para cultura primária. **(A)** Tecido sendo lavado em PBS. Observar como no primeiro poço (seta vermelha) o PBS fica bem turvo. Já no terceiro poço o PBS está bem translúcido (seta amarela), mostrando que o tecido está limpo. **(B)** Tecido deve ser minuciosamente cortado para ser colocado em cultura (seta azul), o que garante uma melhor adesão do tecido e consequente expansão das células.

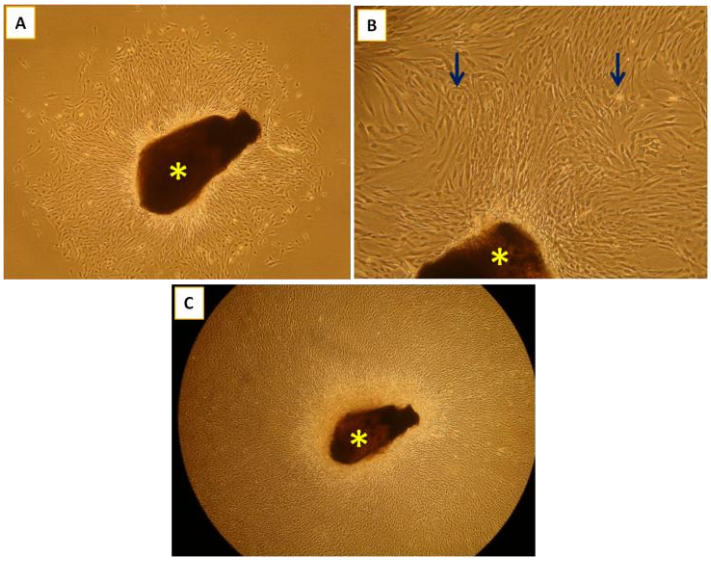

Figura 5: Cultura primária do periósteo. **(A)** Células saindo do tecido após 7 dias em cultura. **(B)** Maior aumento, observa-se o alongamento das células para o contato célula-célula (setas azuis). **(C)** Células bastante confluentes após 13 dias em cultura. **Asterisco amarelo**: Pequeno pedaço de periósteo colocado em cultura.

4.3 Avaliação do Efeito do T3 e NH3 no Crescimento e Viabilidade Celulares

Inicialmente foi feito um experimento para avaliar o efeito da densidade celular. Para tanto, as células com a mutação S252W foram plaqueadas em densidades de $5x10^3$, $10x10^3$ e $15x10^3$ células/poço em placas de 12 poços (Corning, NY, USA) em meio de crescimento (MC) por 11 dias, e contadas nos dias 1, 2, 4, 7, 9 e 11. Todas as contagens foram realizadas em hemocitômetro (Improved Neubauer, Arienfeld, Germany) após tripsinização como previamente descrito (Beber et al., 2009). Em seguida foi feito um experimento plaqueando as células com a mutação S252W nas densidades de $4x10^4$ e $8x10^4$ células/poço em placas de 12 poços (Corning, NY, USA) em MC por 12 dias, sendo as células contadas nos dias 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 12. O experimento seguinte foi para analisar o efeito do T3 e/ou NH3 no crescimento celular. Células com a mutação P253R foram plaqueadas na densidade de $8x10^4$ células/poço em placas de 12 poços em MC. Após 72 horas, o MC foi retirado, a placa lavada com PBS e, então, adicionado meio de carenciamento, cuja composição foi igual à do meio de crescimento, mas com adição de soro tratado com carvão ativado (MST) (o qual remove material não polar, isto é, certos fatores de crescimento, hormônios – inclusive hormônio tireoideano – citocinas, independente de seu peso molecular) para que o hormônio próprio do soro não interferisse no tratamento. Após 24 horas, o meio de carenciamento foi

substituído por meio de tratamento (MT), que contém a mesma composição do MC com adição dos hormônios. Este é considerado o dia 0 (zero) do estudo. Neste dia, foi contado o número de células em 3 poços. Nos demais poços, o meio de cultura foi trocado por meio contendo 10^{-8} M de T3 (placa T3), 10^{-8} M de NH3 (placa NH3), ambos os tratamentos (placa T3+NH3) ou nenhum tratamento (placa Controle). Foram realizadas contagens do número de células por poço nos dias 2 (após 48 horas de tratamento), 4 e 6, sendo contados 3 poços por tratamento. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas após o início do tratamento hormonal, em função da meia vida do T3.

O experimento seguinte foi feito para determinar uma quantidade de soro suficiente para a manutenção das células em substituição ao MST, definindo $4x10^4$ células/poço a densidade padrão para os experimentos seguintes. Células normais foram plaqueadas na densidade de $4x10^4$ células/poço em placas de 12 poços em MC. Após 24 horas o MC foi retirado, a placa lavada com PBS e, então, adicionado meio de carenciamento, cuja composição foi igual à do meio de crescimento mas com soro em concentrações de 0,5%, 1%, 2%, MC e MST (contendo 15% de soro). As contagens do número de células por poço foram feitas nos dias 1, 2 e 3.

Definida a quantidade de célula a ser plaqueada ($4x10^4$ células/poço) e a quantidade de soro a ser utilizada (2%) avaliamos o efeito do T3 e NH3 no crescimento das células periósticas humanas portadoras da mutação P253R e de células normais. As células foram plaqueadas e após 24 horas foram lavadas com PBS e colocadas em meio carenciado (2%). Após mais 24 horas o meio de carenciamento foi substituído por meio de tratamento (MT), que contém a mesma composição do meio carenciado com adição dos hormônios. Este é considerado o dia 0 (zero) do estudo. Neste dia, foi contado o número de células em 3 poços. Nos demais poços, o meio de cultura foi trocado por meio contendo 10^{-8} M de T3 (placa T3), 10^{-8} M de NH3 (placa NH3), ambos os tratamentos (placa T3+NH3) ou nenhum tratamento (placa Controle). Foram realizadas contagens do número de células por poço no dia 1 (após 24 horas de tratamento) e dia 4, sendo contados 3 poços por tratamento. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas após o início do tratamento hormonal, em função da meia vida do T3. Todas as contagens foram realizadas em hemocitômetro (Improved Neubauer, Arienfeld, Germany) após tripsinização como previamente descrito (Beber et al., 2009). Nesses mesmos dias,

a viabilidade celular foi determinada utilizando-se todas as células de cada poço, ou seja, as células aderidas à placa e as células em suspensão no meio de cultura, utilizando-se Azul de Tripan a 0.4% (Gibco-BRL), na diluição 1:2, também como descrito previamente (Beber et al., 2009).

4.4 Avaliação do Efeito do T3 e NH3 na Diferenciação Osteoblástica

4.4.1. Curva dose-resposta de T3 ou NH3:

As células foram plaqueadas, em triplicatas para cada grupo, numa densidade de $4x10^4$ células/poço, em placas de 12 poços. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram carenciadas com meio contendo soro 2% e, após 24 horas, foram passadas para meio de diferenciação osteogênica (MO) [Meio suplementado com 2 % de FBS, 10^{-7} M de dexametasona (Sigma), 50 µM de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma) e 10 mM de β-glicerolfosfato (Sigma)] contendo T3 ou NH3 ou não contendo nenhum tratamento (controle). As concentrações do tratamento com T3 ou NH3 foram nas doses de 10^{-7} M, 10^{-8} M e 10^{-10} M, sendo o meio trocado todos os dias. Com o intuito de detectar nódulos de mineralização, que é uma medida da diferenciação osteoblástica, no nono dia as células foram submetidas em MO à coloração com vermelho de alizarina e quantificadas.

As células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol 70% a temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas 3x com água Milli Q e deixadas numa solução de vermelho de alizarina 0,2% [0,2 g de Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich) em 100 mL de PBS] por 30 minutos. Em seguida, lavou-se 3x com PBS, o excesso foi retirado e deixou-se a amostra secar. Para a análise quantitativa, as células foram incubadas com 20% de metanol + 10% de Ácido Acético (diluídos no PBS) por 15 minutos e, em seguida, determinou-se a densidade óptica do sobrenadante utilizando o leitor de ELISA (Mod. MultSkan FC - Thermo Scientific) com filtro de 450 nm.

4.4.2 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina:

As células foram plaqueadas, em triplicatas para cada grupo, numa densidade de $4x10^4$ células/poço, em placas de 12 poços. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram carenciadas com meio contendo soro 2% e, após 24 horas, foram passadas para meio de diferenciação osteogênica contendo T3 (10^{-8} M) e/ou NH3 (10^{-8} M) ou não contendo nenhum tratamento (controle). As células foram mantidas neste meio até o fim do experimento. A avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina foi feita no dia 9 de diferenciação. Tubos foram nomeados para cada poço de células e preparados com 500 µL de NaOH 1 M. As células foram lavadas com PBS e, posteriormente, adicionou-se 500 µL de solução substrato previamente preparada [5 mg de Substrato Fosfatase + 5 mL de Tampão do substrato (1,88 g de glicina + 0,1017 g de $MgCl_2$ dissolvidos em 500 mL de água. pH 10,5 ajustado com NaOH 1 M)]. Incubou-se as células por 15 minutos com essa solução substrato e, em seguida, transferiu-se a solução de cada poço para o tubo correspondente, previamente preparado. A fosfatase alcalina produzida nas células cliva o íon fosfato do substrato (p-nitrofenil fosfato). O produto desta reação, o p-nitrofenol, pode ser medido colorimetricamente por adição de uma solução alcalina. Foi feita uma curva padrão utilizando-se P-nitrofenol [1*00 µL de P-nitrophenol Standard Solution (Sigma) diluídos em 9,90 mL de 0,02 M de NaOH*] em concentrações de 9, 18, 36, 54, 72 e 90 nmol/mL). A quantidade de p-nitrofenol liberada do substrato foi determinada, então, comparando com a curva padrão gerada. A quantificação do sobrenadante foi feita utilizando o leitor de ELISA (Mod. MultSkan FC - Thermo Scientific) com filtro de 405 nm.

4.4.3 Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização

As células foram plaqueadas em triplicatas em uma densidade de $4x10^4$ células/poço em placas de 12 poços em MC. Após 24 horas, foram transferidas para meio de carenciamento e, após 24 horas, transferidas para MO. Em seguida, as células foram tratadas com 10^{-8} M de T3 e/ou NH3, ou não receberam nenhum tratamento (Controle). As células permaneceram em MO por 21 dias, sendo que este meio foi trocado a cada 24 horas. Com o intuito de detectar nódulos de

mineralização, que é uma medida da diferenciação osteoblástica, as células foram submetidas nos 3º, 6º, 9º, 14º e 21º dias em MO à coloração com vermelho de alizarina e quantificadas, como descrito previamente na seção 4.4.1.

4.4.4 Avaliação da Expressão de Genes Marcadores da Diferenciação Osteoblástica

Todo o procedimento de plaqueamento e tratamento das células foi o mesmo descrito na seção 4.4.3. Entretanto, para a extração do RNA as células foram plaqueadas numa densidade de 10^5 células/poço em placas de 6 poços, em duplicata. No dia 9 e 21, as células foram coletadas e processadas para a extração de RNA total para posterior estudo da expressão gênica do fator de transcrição determinante da diferenciação osteoblástica (RUNX2), BGLAP (osteocalcina) ou do Receptor de Fator de Crescimento Fibroblástico tipo 2 (FGFR2).

4.5 PCR em Tempo-Real

O RNA total foi extraído das células utilizando o reagente TRizol (Gibco, BRL), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado por espectrofotometria. A integridade do RNA foi observada através de gel de agarose a 1%. 1 µg de RNA total foi transcrito reversamente a cDNA utilizando oligo(dT) e a enzima transcriptase reversa (*ReverAid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*, Fermentas, Hanover, MD, USA) em uma reação de 20 µL de volume, seguindo o seguinte protocolo: 10 minutos a 70 °C, transcrição reversa a 42 ºC por 60 minutos, e inativação por calor da transcriptase reversa a 95 °C por 10 minutos no termociclador MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycle, GMI, Minnesota, USA). Os *primers* específicos para os genes de interesse foram desenhados através do *software* Primer Express Version 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Tab. 1), a partir das seqüências publicadas dos respectivos genes, e sintetizados pela Applied Biosystems do Brasil com purificação por HPLC (*high-performance liquid chromatography*).

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATG
BGLAP	TTTCAGGAGGCCTATCGGCGCT	ACATCCATAGGGCTGGGAGGTCA
RUNX2	ATTACAGACCCCAGGCAGGCAC	AAGACAGCGGGGTGGTAGAGTG
FGFR2	CGCTCTGAGCCTTCGCAACTCG	CTGCCCTCGGATTTGGGGAACG

Tabela 1: Primers utilizados para PCR Real Time quantitativo.

Após padronização da quantidade de cDNA e da concentração dos *primers*, os valores relativos à amplificação do mRNA referente a cada gene foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada pelo sistema de detecção de seqüências Real-Time PCR ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume total de 25 µL utilizando-se *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). O cDNA foi amplificado em duplicata nas seguintes condições: 1 ciclo a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método $\Delta\Delta$Ct como previamente descrito por Livak (1997). Os produtos do PCR em tempo real foram analisados em gel de agarose a 2.2% para confirmar a especificidade dos *primers*. Para corrigir diferenças decorrentes da eficiência da transcrição reversa e da qualidade do RNA total, os níveis de mRNA dos genes de interesse foram normalizados pelos níveis de mRNA do GAPDH na mesma amostra.

4.6 Análise Estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos para qualquer parâmetro foi testada pela análise de variância (ANOVA) ou pelo teste-t (Student t-test). ANOVA é sempre seguida pelo teste de comparação múltipla *Student-Newman-Keuls*, para detectar quais grupos são significativamente diferentes entre si. Para todos os testes, foi admitido o limite de 5% para rejeição da hipótese de nulidade. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da

média (EPM). Para a realização dos testes estatísticos e para a construção de gráficos foi utilizado o software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do T3 e NH3 no Crescimento das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação S252W

Inicialmente foi feito um experimento plaqueando células com a mutação S252W nas densidades de $5x10^3$, $10x10^3$ e $15x10^3$ células/poço. Observamos que o crescimento celular foi muito lento em todas as três densidades testadas, sendo uma fase "lag" muito longa, permitindo o crescimento exponencial (fase "log") somente após 7 dias de tratamento. Notou-se, ainda, que as células cresceram insuficientemente em todas as densidades, especialmente aquelas plaqueadas a uma densidade de $5x10^3$ células/poço.

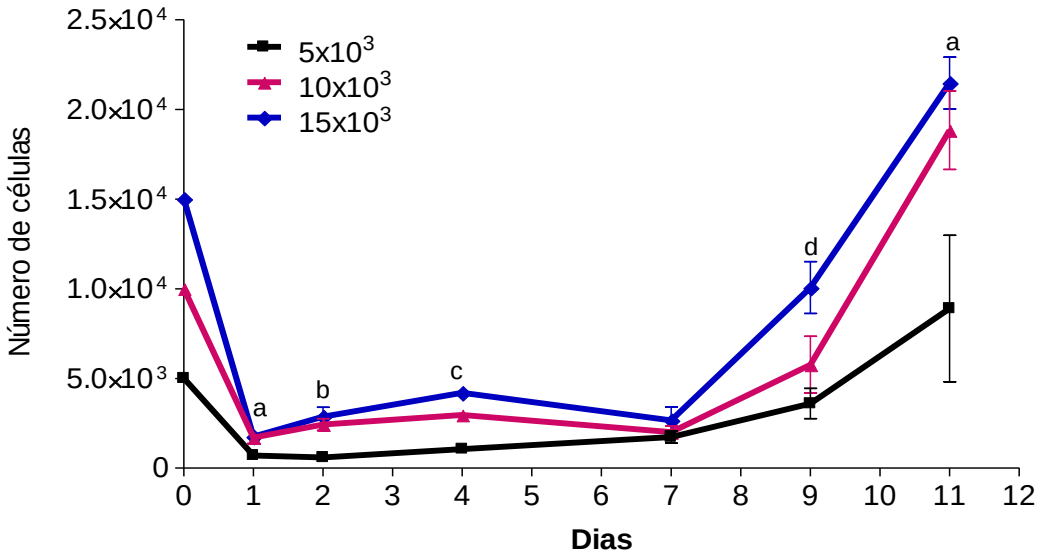

Figura 6: Análise de diferentes concentrações celulares ($5x10^3$; $10x10^3$ e $15x10^3$ células/poço) em relação ao crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W. Todos os valores são expressos como média ± EPM. a – $5x10^3$ *vs* $10x10^3$ e $15x10^3$ ($p<0.05$); b – $5x10^3$ *vs* $10x10^3$ $p<0.05$ e $5x10^3$ *vs* $15x10^3$ $p<0.01$; c – $5x10^3$ *vs* $10x10^3$ e $10x10^3$ *vs* $15x10^3$ $p<0.01$ para ambos, e $5x10^3$ *vs* $15x10^3$ $p<0.001$; d – $5x10^3$ *vs* $15x10^3$, $p<0.05$. A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

Visto que a fase lag muito longa (Fig. 6) não permite uma boa avaliação do crescimento celular, podendo até mesmo levar a senescência celular, alteramos o número de células a serem plaqueadas, nos baseando em experimentos anteriores

realizados em nosso laboratório utilizando células MC3T3-E1 de camundongos e células ROS17/2.8 de ratos (Beber et al., 2009). As células com a mutação S252W foram, então, plaqueadas nas densidades de $4x10^4$ e $8x10^4$ células/poço.

Observamos que as células plaqueadas na densidade de $4x10^4$ e de $8x10^4$ células/poço, apresentaram um crescimento similar (Fig. 7). Diferentemente do que foi visto no experimento anterior com menor densidade de células, as células apresentaram um período platô a partir do sexto dia, depois de passar pela fase exponencial (Fig. 7).

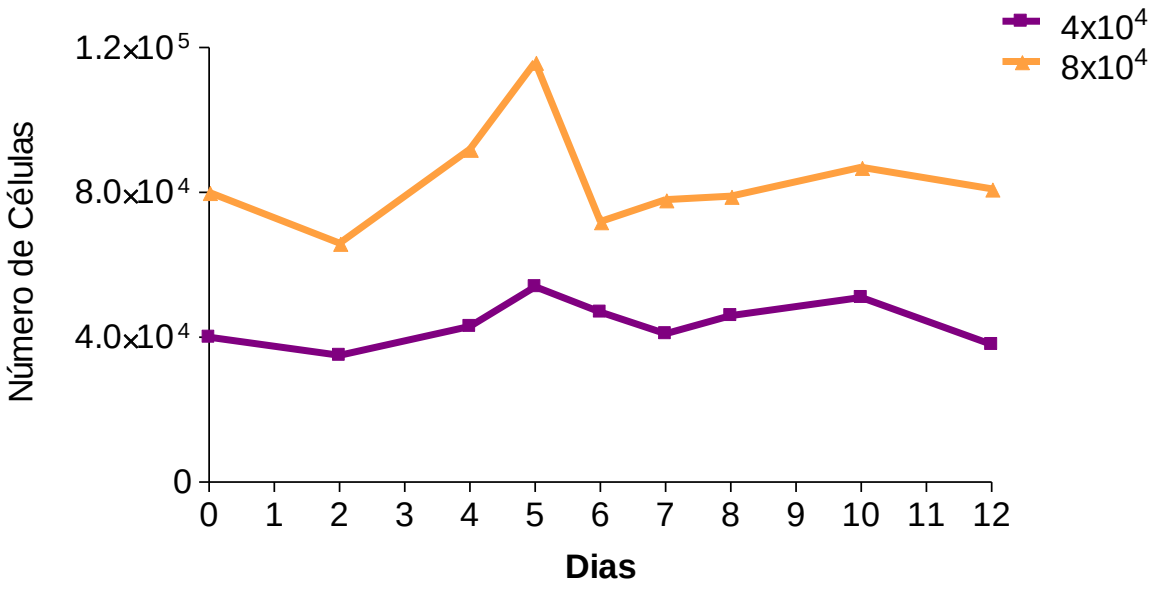

Figura 7: Análise de diferentes concentrações celulares ($4x10^4$ e $8x10^4$ células/poço) em relação ao crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação S252W.

5.2 Efeito do T3 e NH3 no Crescimento das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R

Devido à escassez de células de pacientes portadores da mutação S252W, no banco de células do laboratório, alteramos os estudos para as células com a mutação P253R. Neste experimento, as células foram plaqueadas numa densidade de $8x10^4$ células/poço; após 72 horas, as células foram passadas para o meio carenciado, isto é, com soro tratado com carvão ativado (MST) e, após 24 horas, foi dado o início ao tratamento hormonal, o qual foi mantido por 6 dias.

Houve uma diminuição do crescimento celular após 24 horas em MST (Fig. 8). No segundo dia de tratamento, o tratamento com T3 foi capaz de frear esta diminuição, mantendo uma densidade celular significativamente mais alta em relação ao controle (2 vezes mais, $p<0.01$). É digno de nota que o NH3 bloqueou essa ação do T3. Entretanto, o NH3 sozinho também foi capaz de frear a diminuição do crescimento celular, mantendo um número de células 1.7 vezes maior do que as células controle ($p<0.05$) e 1.5 vezes maior do que as células T3+NH3 ($p<0.05$). É interessante observar que a partir do terceiro dia em meio contendo soro tratado com carvão ativado (dia 2), as células controle começaram a apresentar um crescimento exponencial que perdurou até o final do estudo (dia 6), enquanto as células tratadas com T3 apresentaram redução do crescimento celular entre os dias 4 e 6 de tratamento. Novamente, o NH3 bloqueou esta ação inibitória do T3, uma vez que as células tratadas com T3+NH3 também apresentaram crescimento exponencial entre os dias 2 e 6 de tratamento (Fig. 8).

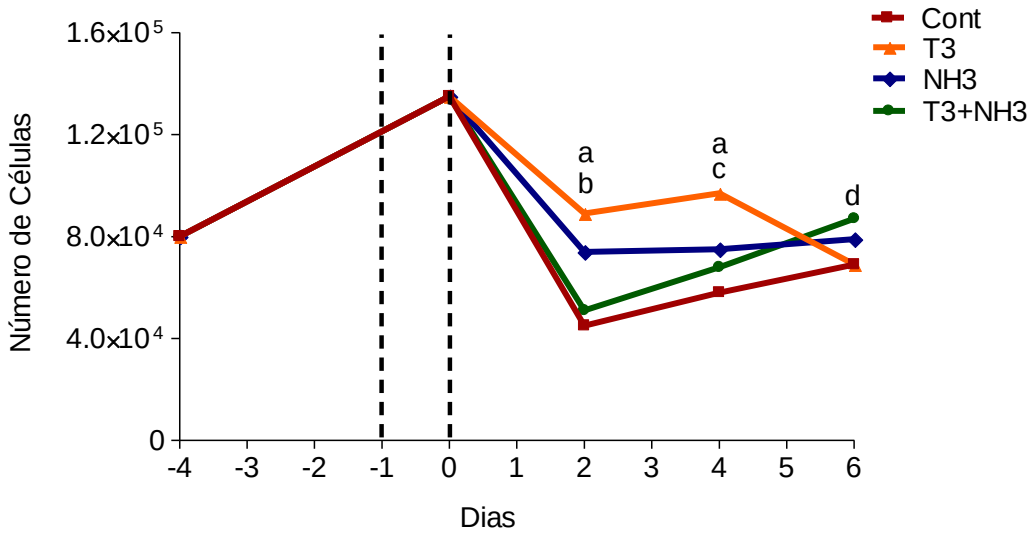

Figura 8: Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8}M) no crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação P253R. Todos os valores são expressos como média ± EPM. a – T3 *vs* Cont, $p<0.01$ e NH3 *vs* Cont, $p<0.05$; b – T3+NH3 *vs* T3, $p<0.01$ e T3+NH3 *vs* NH3, $p<0.05$; c – T3 *vs* NH3 e T3 *vs* T3+NH3, $p<0.01$ para ambos; d – T3+NH3 *vs* Cont e T3+NH3 *vs* T3, $p<0.05$ para ambos. **Dia -1** Carenciamento **Dia 0** Início do tratamento com T3 e/ou NH3. A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

No experimento anterior, apesar de observarmos uma diferença significativa entre os diferentes tratamentos, observamos também que houve uma grande diminuição do número de células após estas serem colocadas em MST. Para tanto, resolvemos avaliar a curva de crescimento das células em meios com diferentes concentrações de soro não tratado com carvão ativado (0.5%, 1%, 2% e 15%) e com 15% de soro tratado com carvão ativado (MST). Além disso, como as células apresentaram um crescimento parecido nas densidades de $4x10^4$ células/poço e $8x10^4$ células/poço, decidimos utilizar $4x10^4$ células/poço nos experimentos seguintes, visto que é uma quantidade suficiente para a realização dos experimentos. As células foram, então, plaqueadas numa densidade de $4x10^4$ células/poço e contadas nos dias 1, 2 e 3 após carenciamento (Fig. 9). Observamos, também, que o carenciamento e tratamento das células poderiam ser iniciados 24 hs e 48 hs após o plaqueamento, respectivamente. Dessa forma, teríamos condição de avaliar o efeito do hormônio tireoideano e NH3 no início do crescimento celular exponencial.

Como podemos observar, as células mantidas em meio contendo 2% de soro tiveram um crescimento semelhante ao das células mantidas em meio contendo 15 % de soro (MC). No dia 1 de tratamento, as células mantidas em MST estavam significativamente em menor número do que as células mantidas com os outros meios. Os poços contendo meio com 0.5%, 1%, 2% e 15% de soro estavam com um número significativamente maior de células do que aqueles com MST, sendo esta diferença de 57,4%; 52,3%; 74,2% e 71,6%, respectivamente ($p<0.01$ para todos). No dia 2, os poços com meio contendo 2% de soro apresentaram um crescimento celular maior do que aqueles com meio contendo 0,5% de soro (51,4%, $p<0.05$) e MST (44,96%, $p<0.05$) (Fig. 9).

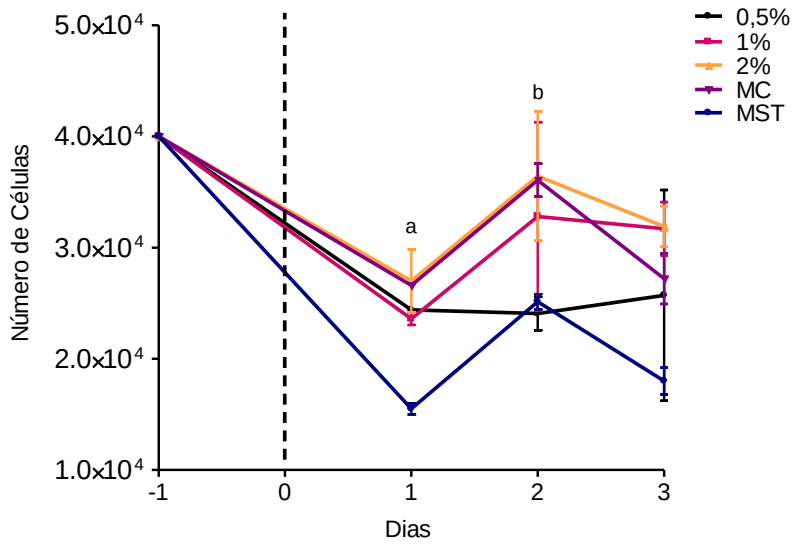

Figura 9: Efeito da concentração de soro fetal bovino (0.5%, 1%, 2%, MC ou MST) no crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas normais. Todos os valores são expressos como média ± EPM. **a** – MST *vs* todos, $p<0.01$; **b** – 2% *vs* 0.5% e 2% *vs* MST, $p<0.05$ para ambos. **Dia 0** = Carenciamento **MC**= Meio Completo (soro 15%); **MST**= Meio com soro tratado com carvão ativado (soro 15%). A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

Visto que um meio contendo 2% de soro é considerado meio de carenciamento, esta porcentagem de soro foi estipulada para os experimentos para avaliação dos efeitos do T3 e/ou NH3 no crescimento e diferenciação celular.

5.3 Crescimento das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais

A análise do crescimento celular mostra que a célula com a mutação P253R cresce significativamente mais do que a célula normal. No dia -2, foi feito o plaqueamento e, após 24 horas, o carenciamento (dia -1). Nos dias 0, 1 e 4, as células com a mutação P253R cresceram 2, 1,4 e 1,7 vezes mais do que as células normais, respectivamente (Fig. 10).

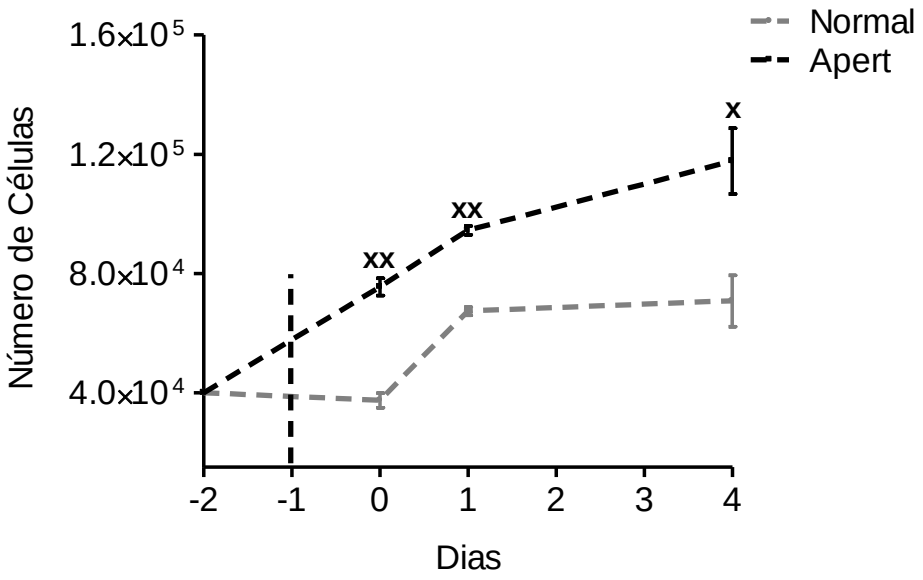

Figura 10: Crescimento das células mesenquimais periósticas humanas normais e das células portadoras da mutação P253R. Todos os valores são expressos como média ± EPM. x $p<0.05$, xx $p<0.01$ *vs* normal. **Dia -1** Carenciamento. A significância estatística foi determinada por Teste-T não pareado.

5.4 Efeito do T3 e NH3 no Crescimento e Viabilidade das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais

O tratamento de células normais com T3 e/ou NH3 não alterou o crescimento celular, mantendo o número de células igual ao das células controle (sem tratamento) (Fig. 11A).

De forma bastante interessante, e diferentemente do que ocorreu nas células normais (Fig. 11A), observamos que o T3 induziu uma elevação no número das células portadoras da mutação P253R durante todo o período de tratamento, sendo que, no dia 4, o número de células era 25% maior do que o das células sem tratamento ($p<0.05$) (Fig. 11B). A associação do NH3 com o T3 impediu a elevação significativa do número de células induzida pelo T3, enquanto que o NH3 sozinho praticamente não alterou o crescimento celular (Fig. 11B).

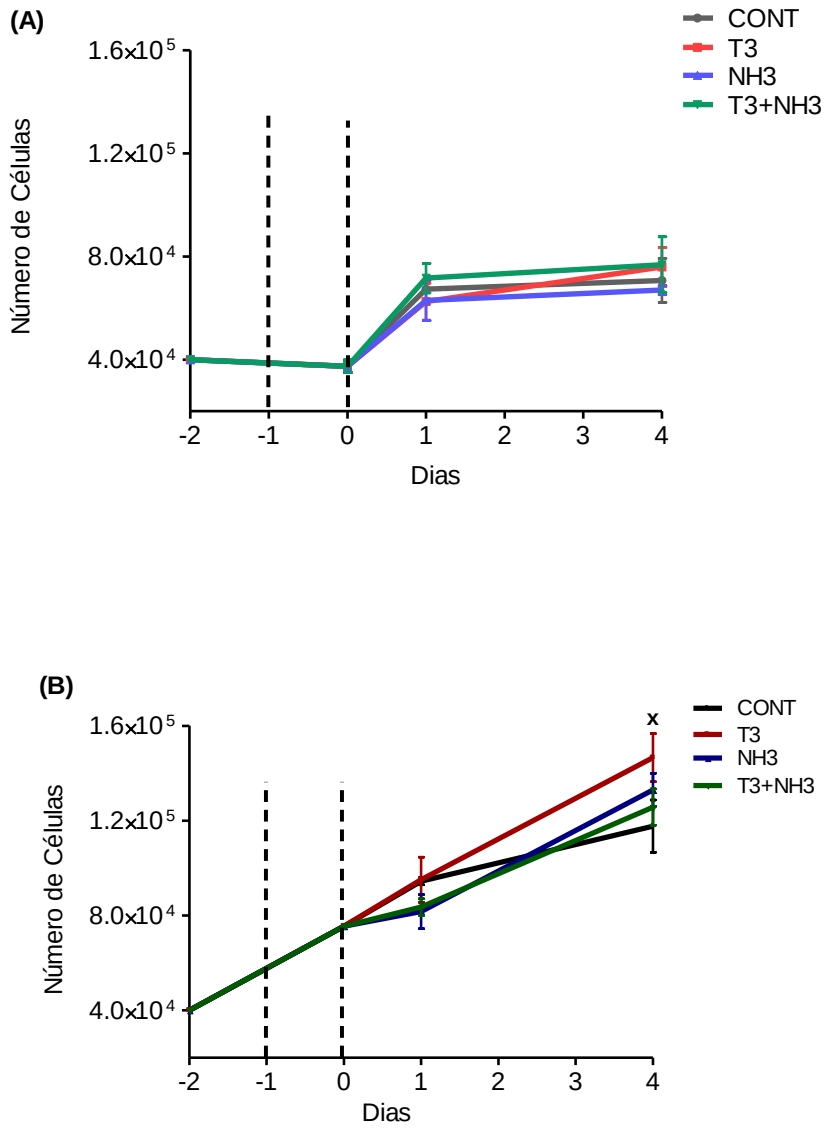

Figura 11: Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8}M) no crescimento celular de células mesenquimais periósticas humanas **(A)** normais (sem doença óssea) e **(B)** portadoras da mutação P253R. **Dia -1** Carenciamento; **Dia 0** Início do tratamento com T3 e/ou NH3; **Cont** = controle (células não tratadas). Todos os valores são expressos como média ± EPM x – T3 *vs* Cont, $p<0.05$. A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

Observamos, também, que a viabilidade das células não foi alterada por nenhum tratamento durante todo o período experimental, tanto nas células normais (Fig. 12A), quanto nas células com a mutação P253R (Fig. 12B).

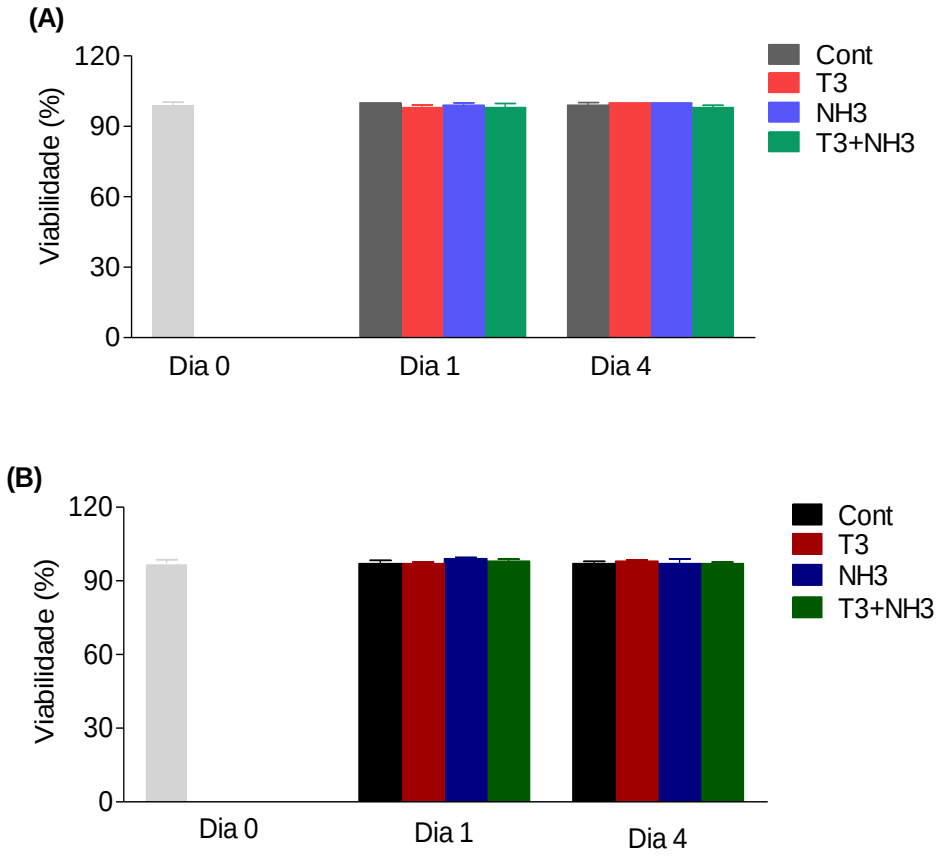

Figura 12: Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8}M) na viabilidade de células mesenquimais periósticas humanas **(A)** normais (sem doença óssea) e **(B)** portadoras da mutação P253R. **Cont = controle (células não tratadas)**. Todos os valores são expressos como média ± EPM.

Os resultados desses experimentos mostram que, diferentemente das células normais (Fig. 11A), as células mutadas respondem positivamente ao T3 quanto ao crescimento celular (Fig. 11B). Além disso, observamos que tanto o T3 quanto o NH3 não alteram a viabilidade das células normais e mutadas (Fig. 12).

5.5 Diferenciação das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais.

Para avaliar o processo de diferenciação das células normais e mutadas, avaliamos a formação de nódulos de mineralização e a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica. A formação de nódulos de mineralização

(depósitos de cálcio) em cultura reflete a presença de osteoblastos maduros e, portanto, reflete a diferenciação osteoblástica.

Pudemos comprovar que, durante o período inicial da diferenciação osteoblástica (dia 6), as células com a mutação P253R já apresentam uma maior quantidade de nódulos de mineralização em relação às células normais (1,27x). Nos dias 9, 14 e 21, a discrepância de formação dos nódulos de mineralização entre as células com a mutação P253R e as células normais se torna ainda mais aparente. A formação dos nódulos de mineralização foi, em média, 2,5 vezes maior nas células portadoras da mutação P253R comparadas às células normais (Fig. 13).

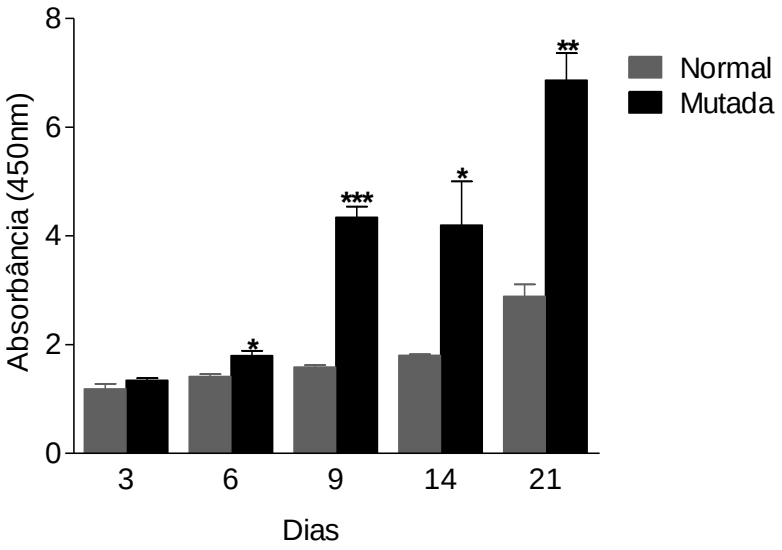

Figura 13: Formação de nódulos de mineralização em células mesenquimais periósticas humanas normais (sem doença óssea) e portadoras da mutação P253R. As células foram mantidas em meio de diferenciação osteoblástica por 21 dias. Os nódulos foram marcados com Vermelho de Alizarina, solubilizados com ácido acético e metanol e o cálcio foi determinado por colorimetria nos dias 3; 6; 9; 14 e 21. Todos os valores são expressos como média ± EPM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$, todos *vs* normal. A significância estatística foi determinada por Student-t test.

A expressão gênica do RUNX2, um membro da família *runt* de fatores de transcrição, que além de exercer um papel pivô na regulação da diferenciação de precursores osteoblásticos, também tem papel importante na indução da atividade de osteoblastos maduros (Kim et al., 2003; Park., 2001) estava 85 vezes maior ($p<0.001$) na célula com a mutação P253R comparada com a célula normal (Fig. 14).

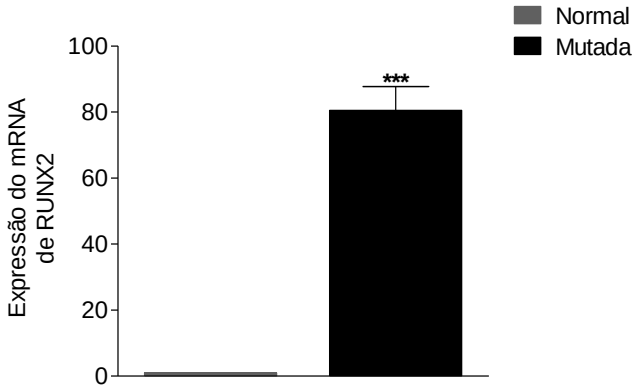

Figura 14: Comparação da expressão do mRNA do gene RUNX2 entre células normais e células com a mutação P253R. Todos os valores são expressos como média ± EPM. *** p<0.001 *vs* normal. A significância estatística foi determinada por Teste-T não pareado.

Apesar do aumento do RUNX2, observamos uma resposta diferente da expressão do mRNA da osteocalcina. A célula com a mutação P253R apresentou uma expressão da osteocalcina 2,65 vezes menor (p<0.05) do que a célula normal (Fig. 15).

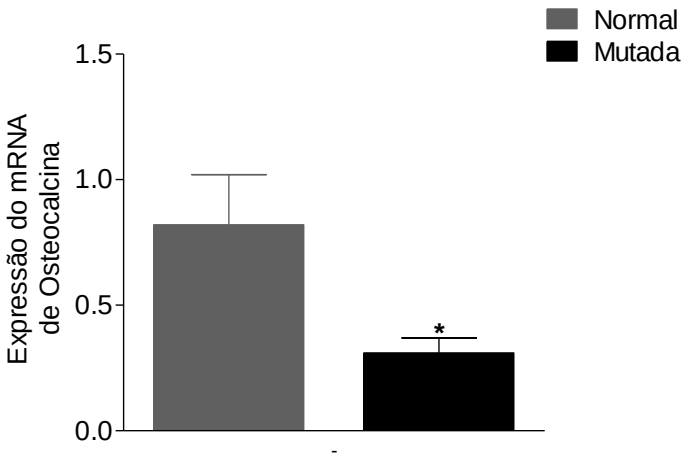

Figura 15: Comparação da expressão do mRNA do gene osteocalcina (BGLAP) entre células normais e células com a mutação P253R. Todos os valores são expressos como média ± EPM. * p<0.05 *vs* normal. A significância estatística foi determinada por Teste-T não pareado.

A análise do mRNA do FGFR2 mostrou que as células mutadas apresentavam expressão gênica 8 vezes maior (p<0,01) do que as células normais (Fig. 16).

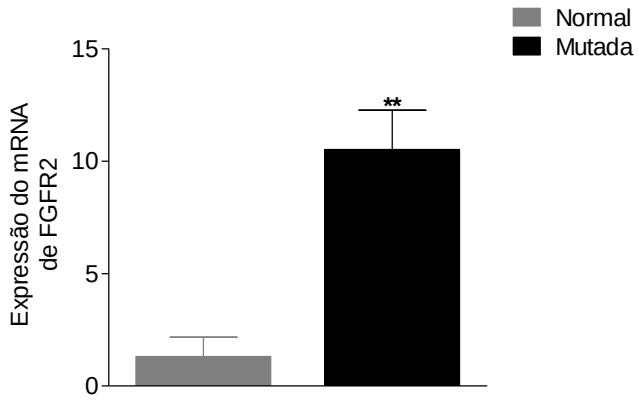

Figura 16: Comparação da expressão do mRNA do gene FGFR2 entre células normais e células com a mutação P253R. Todos os valores são expressos como média ± EPM. ** p<0.01 *vs* normal. A significância estatística foi determinada por Teste-T não pareado.

5.6 Efeito do T3 e NH3 na Diferenciação das Células Mesenquimais Periósticas Humanas Portadoras da Mutação P253R e das Células Normais.

5.6.1 Curva Dose-Resposta de T3 ou NH3

A avaliação do efeito de doses crescentes de T3 ou NH3 na diferenciação osteoblástica mostrou que, nas células normais, nove dias de tratamento com T3 ou NH3 aumentou a formação dos nódulos de mineralização em relação às células sem tratamento (cont), sendo que não houve diferença entre as doses de T3 ou NH3 administradas (Fig. 17A).

Nas células portadoras da mutação P253R, o T3, em nenhuma das doses, alterou a formação de nódulos de mineralização (Fig. 17B), enquanto 10^{-7}, 10^{-8} e 10^{-10} M de NH3 diminuíram a formação dos nódulos e, portanto, a diferenciação osteoblástica em relação às células não tratadas (cont). A dose de 10^{-10} M de NH3 também reduziu significativamente a formação dos nódulos em relação às células tratadas com 10^{-7} M e 10^{-8} M de T3 (Fig. 17B).

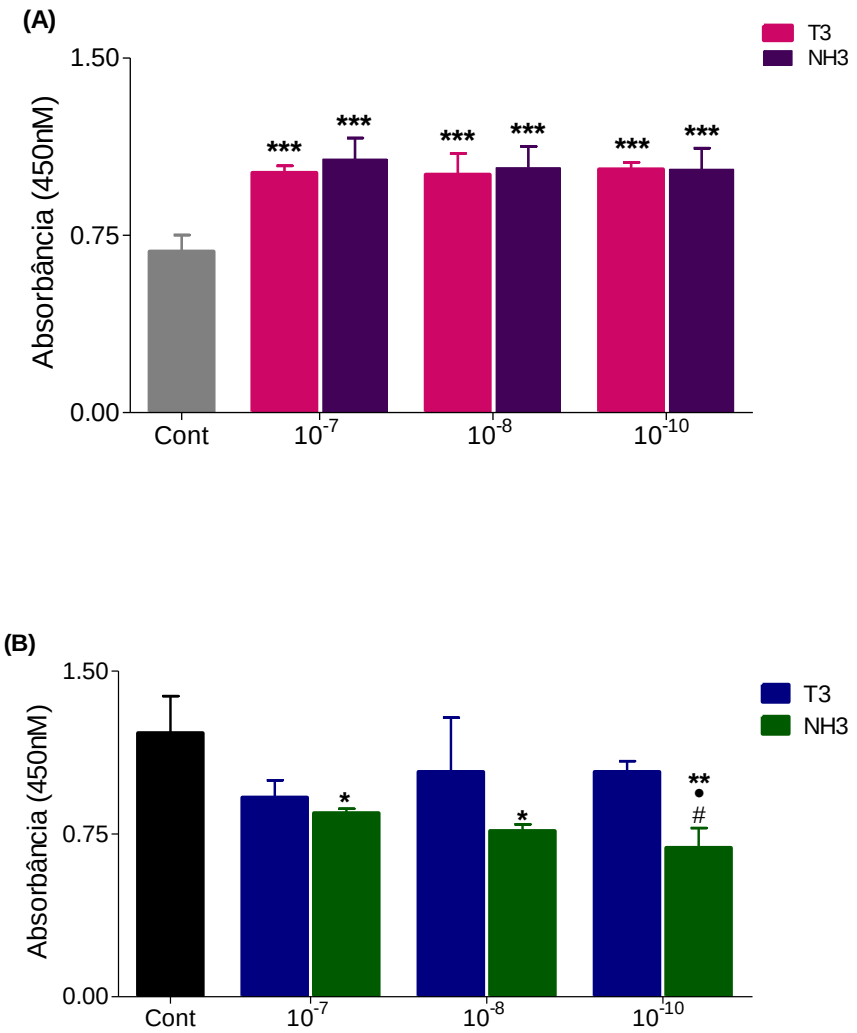

Figura 17: Efeito de doses crescentes de T3 ou NH3 no período de diferenciação osteoblástica de células mesenquimais periósticas humanas **(A)** normais e **(B)** portadoras da mutação P253R. As células foram mantidas em meio de diferenciação osteoblástica e tratadas com 10^{-7}, 10^{-8} e 10^{-10} M de T3 ou NH3 por 9 dias. Os nódulos foram marcados com Vermelho de Alizarina, solubilizados com ácido acético e metanol e o cálcio foi determinado por colorimetria. **Cont = controle (células não tratadas)**. Todos os valores são expressos como média ± EPM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$ *vs* Cont (células não tratadas). • $p<0.05$ *vs* 10^{-8} M de T3, # $p<0.05$ *vs* 10^{-10} M de T3. A significância estatística foi determinada por Student-t test.

5.6.2 Avaliação da Atividade da Fosfatase Alcalina:

É sabido que, normalmente, há um pico de atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) entre o 9º e 12º dias de diferenciação, portanto avaliamos sua atividade no 9º dia, através da leitura de absorbância, utilizando-se um leitor de ELISA (Mod. MultSkan FC - Thermo Scientific) com filtro de 405 nm.

Podemos observar que, bem no começo do processo de diferenciação osteoblástica das células, o T3, NH3 e a associação dos dois provocam um aumento

significativo na atividade da ALP comparados às células sem tratamento (3.6x; 3.3x e 3.2x, respectivamente, p<0.001 para todos), refletindo uma ação positiva na diferenciação osteoblástica. Além disso, as células tratadas com T3+NH3 mostraram uma atividade da ALP 10.6% menor do que aquelas tratadas com T3 (p<0.05) (Fig. 18A). Já nas células com a mutação não houve uma diferença significativa entre os grupos. É importante observar, entretanto, que todos os grupos das células mutadas apresentaram uma maior atividade da ALP se comparados aos grupos das células normais (Fig.18B), o que sugere uma diferenciação osteoblástica acelerada nas células portadoras da mutação.

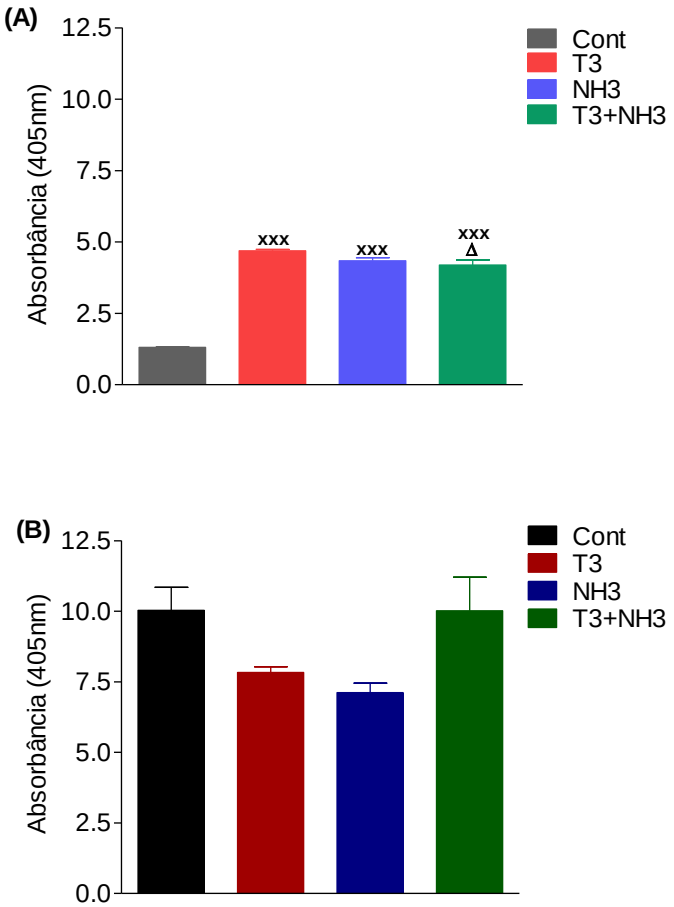

Figura 18: Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8}M) na atividade da fosfatase alcalina em células mesenquimais periósticas humanas **(A)** normais e **(B)** portadoras da mutação P253R. As células foram mantidas em meio de diferenciação osteoblástica por 21 dias. A atividade da ALP foi determinada no dia 9. **Cont = controle (células não tratadas).** Todos os valores são expressos como média ± EPM. xxx - *vs* Cont, p<0.001; Δ - *vs* T3, p<0.05. A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

5.6.3 Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização

O tratamento com T3 e/ou NH3 alteraram a formação dos nódulos de mineralização, havendo diferenças significativas entre os grupos tanto das células normais quanto das células mutadas no 21º dia do estudo de diferenciação (Fig. 19A e B). O T3 aumentou significativamente (2.3x; $p<0.05$) a formação de nódulos de mineralização em células normais, o que reflete uma aceleração da diferenciação osteoblástica, em relação às células não tratadas (cont) (Fig. 19A). Observamos, ainda, em células normais, que o NH3 bloqueou a formação dos nódulos de mineralização induzida pelo hormônio tireoideano (3x *vs* T3, $p<0.05$), mantendo os níveis parecidos aos do grupo controle tanto sendo administrado sozinho, quanto estando associado ao T3 (Fig. 19A). Surpreendentemente, nas células mutadas, observamos que o T3 não alterou o processo de formação de nódulos como ocorreu nas células normais (Fig. 19B). Por outro lado, o NH3 sozinho bloqueou e, até mesmo, reduziu a formação de nódulos nessas células mutadas para níveis significativamente menores do que aqueles das células que não receberam tratamento (43.3% *vs* Cont, $p<0.001$). Mais surpreendentemente ainda, foi ver que o T3 associado ao NH3 não alterou essa resposta do NH3 (42% vs Cont, $p<0.001$) (Fig. 19B).

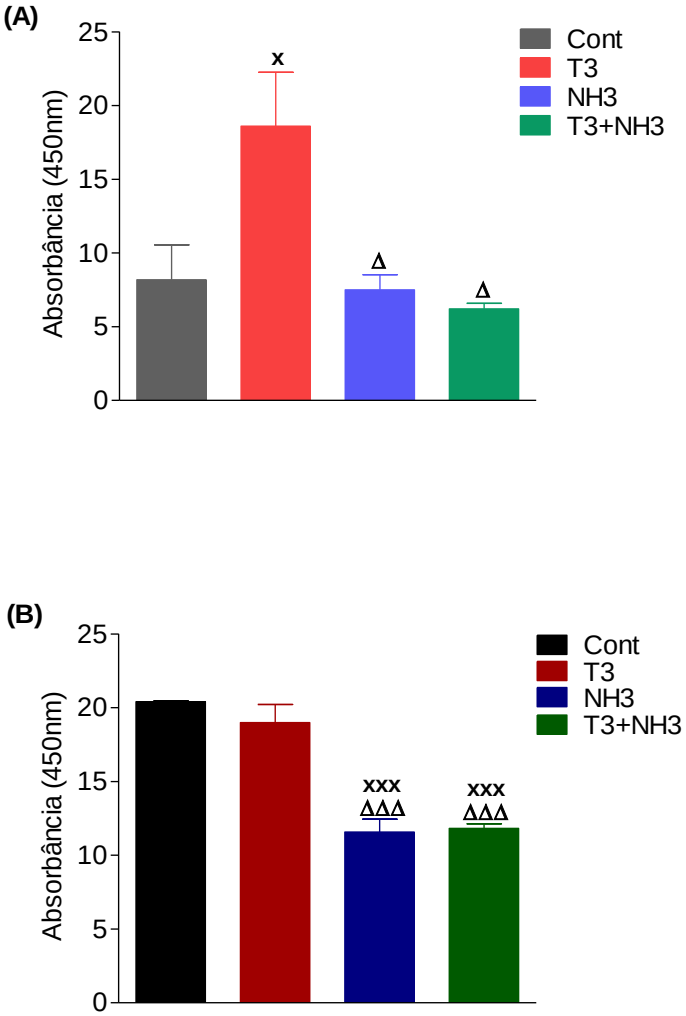

Figura 19: Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8}M) na formação de nódulos de mineralização em células mesenquimais periósticas humanas **(A)** normais e **(B)** portadoras da mutação P253R. Os nódulos foram marcados com vermelho de alizarina, solubilizados com ácido acético e metanol e o cálcio foi determinado por colorimetria no dia 21. Todos os valores são expressos como média ± EPM. x *vs* Cont, $p<0.05$; xxx *vs* Cont, $p<0.001$; Δ *vs* T3, $p<0.05$; ΔΔΔ *vs* T3, $p<0.01$. A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

5.6.4 Avaliação da Expressão de Gene Marcador da Diferenciação Osteoblástica

Nas células normais, avaliamos a expressão do RUNX2 e vimos que, após 21 dias em meio de diferenciação, o T3 induziu um aumento significativo na expressão do mRNA do RUNX2 (3x *vs* controle, $p<0.05$), enquanto que o NH3 bloqueou a ação do T3 (Fig. 20).

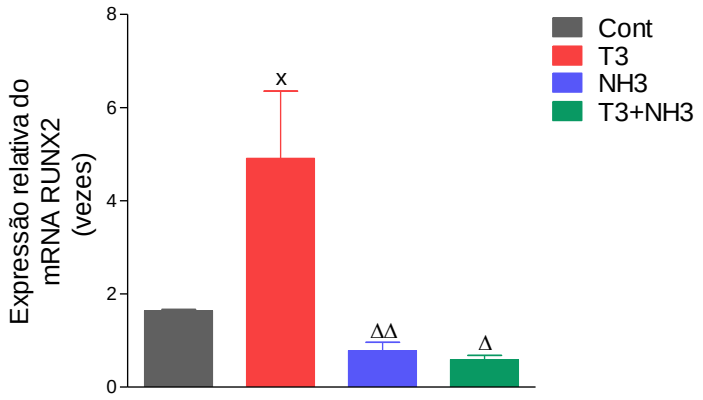

Figura 20: Efeito do T3 e/ou de seu antagonista NH3 (10^{-8}M) na expressão do mRNA do gene RUNX2 de células mesenquimais periósticas humanas normais. **Cont = controle (células não tratadas)**. Todos os valores são expressos como média ± EPM. x *vs* Cont, $p<0.05$; Δ *vs* T3, $p<0.05$; ΔΔ *vs* T3, $p<0.01$. A significância estatística foi determinada por ANOVA e seguida pelo Teste Student-Newmans-Keuls.

6. DISCUSSÃO

Estudos recentes mostram evidências de que há interação do HT com a via de sinalização FGFs/FGFRs em osteoblastos, condrócitos e na lâmina de crescimento epifiseal (Barnard et al., 2005; Bassett et al., 2006; Stevens et al., 2003), o que sugere importantes intercâmbios entre esses dois sistemas no desenvolvimento do esqueleto. A Síndrome de Apert (SA) é uma doença congênita autossômica dominante, determinada por mutações do tipo ganho de função do gene do FGFR2, que, nessa condição, apresenta aumento da sua afinidade pela maior parte dos FGFs. Além disso, há uma sinalização anormal que segue a interação FGF/FGFR2 (Ibrahimi et al., 2001; Ornitz et al., 1996). Observa-se que o fenótipo osteoblástico está alterado nos portadores dessa Síndrome, com um aumento da expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, como por exemplo, RUNX2, ALP, Col1, osteocalcina (Lian et al., 2004; Miraoui et al., 2009). Como consequência, ocorre a craniossinostose de alta penetrância, que, por sua vez, corresponde a 4.5% de todos os casos de craniossinostose em diferentes populações. Em pacientes com craniossinostose, o único tratamento atual é a cirurgia corretiva facial e a craniotomia, para permitir o crescimento do crânio e do encéfalo.

Visto que as alterações osteoblásticas estão presentes e levam à formação desregulada do tecido ósseo na craniossinostose, essas células são as mais estudadas nesta patologia. No entanto, o periósteo, tecido que compõe a complexa estrutura das suturas, também tem sido estudado (Fanganiello et al., 2007; Yeh et al., 2012). O periósteo tem sido mostrado como um tecido importante para o reparo de fraturas, mostrando-se como uma fonte importante de células osteoprogenitoras (Colnot, 2009). Estudos mostraram que enxertos ósseos sem o periósteo apresentam um atraso na recalcificação após defeitos ósseos em crânios de animais (Hopper et al., 1999). Castro-Silva (2012) sugere que células derivadas do periósteo apresentam um interessante potencial para se diferenciar em osteoblastos maduros e promover mineralização *in vitro*. Fanganiello et al. (2007) mostraram que células fibroblastóides do periósteo craniano de pacientes com a mutação S252W apresentaram um perfil de diferenciação osteogênica aumentado quando comparadas ao mesmo tipo de células de indivíduos normais. Outro estudo

corrobora os resultados de Fanganiello sobre o potencial osteogênico das células periósticas fibroblastóides, mostrando que os fibroblastos do periósteo craniano de pacientes com a mutação S252W apresentaram uma proliferação e migração celular aumentadas, comparadas às células de indivíduos normais (Yeh et al., 2012). Viram, ainda, que as células-tronco mesenquimais com a mutação S252W mostraram um efeito negativo na proliferação, nenhum efeito na migração e um efeito positivo na diferenciação osteogênica e que os fibroblastos estimularam positivamente a diferenciação de células-tronco mesenquimais (Yeh et al., 2012). Desta forma, os resultados do presente estudo que mostram uma diferenciação osteoblástica acelerada em células mesenquimais periósticas derivadas de pacientes portadores da Síndrome de Apert corroboram estudos anteriores. Somando-se a isso, mostramos, pela primeira vez, que as células-tronco mesenquimais normais e com a mutação P253R que leva à Síndrome de Apert são responsivas ao tratamento com hormônio tireoideano e com o seu antagonista, NH3.

Para avaliarmos uma possível interação do hormônio tireoideano no mecanismo de ossificação acelerada causada pela mutação com ganho de função no FGFR2, estudamos o efeito da administração de T3 e/ou de seu antagonista NH3 no crescimento das células mesenquimais periósticas humanas portadoras ou não (células normais – derivadas de pacientes sem doença óssea) da mutação P253R e na diferenciação dessas células em osteoblastos.

O primeiro passo desse estudo foi estabelecer as condições de cultura celular para o efetivo tratamento hormonal das células portadoras das mutações que levam à Síndrome de Apert. Inicialmente, fizemos um experimento de crescimento celular com células portadoras da mutação S252W, numa densidade celular de $5x10^3$, $10x10^3$ e $15x10^3$ células/poço. Essas densidades não foram satisfatórias para a análise do crescimento das células. Portanto, aumentamos a densidade de plaqueamento para $4x10^4$ células/poço e $8x10^4$ células/poço. Nessas duas densidades, as células apresentaram um crescimento gradativo a partir do segundo dia até obter um pico no dia 5, seguido, então, por uma diminuição do crescimento e posterior platô. Como não houve uma diferença entre as duas densidades testadas, padronizamos nossos experimentos com plaqueamento de $4x10^4$ cels/poço para os experimentos seguintes de crescimento, viabilidade e diferenciação celular. No primeiro experimento realizado com o tratamento hormonal observamos que, apesar

dos interessantes resultados de interferência do T3 no crescimento das células e do bloqueio desta ação do T3 pelo seu antagonista NH3, as células não estavam em boas condições experimentais. A importante diminuição do número de células após transferi-las para o meio contendo 15% de soro tratado com carvão ativado (MST) sugere que as células estavam em sofrimento. Além disso, percebemos que poderíamos carenciar e iniciar o tratamento das células mais precocemente, o que nos permitiu avaliá-las durante a sua fase de crescimento exponencial. Em função dessas observações, testamos uma alternativa para o MST avaliando a curva de crescimento das células em meio de crescimento com diferentes concentrações de soro (0.5%, 1%, 2% e 15%) em comparação com o MST (15%). Como um meio contendo 2% de soro é considerado meio de carenciamento e como as células se comportaram bem nessa condição, esta porcentagem de soro foi selecionada para os experimentos onde avaliamos o efeito do T3 e NH3. Além disso, o soro fetal bovino contido no meio de cultura pode ter um efeito negativo na diferenciação devido à interferência de fatores de crescimento endógenos interferindo no processo celular (Roberts et al., 2011). O objetivo deste carenciamento foi, principalmente, de manter as células em condições ótimas para os estudos e em meio com a menor quantidade possível de T3 e T4. As células permaneceram no meio carenciado até o fim do experimento, tanto de crescimento e viabilidade quanto de diferenciação.

Apesar dos experimentos iniciais terem sido feitos em células com a mutação S252W, os experimentos seguintes, foram realizados em células com a mutação P253R, uma vez que não havia célula suficiente com a primeira mutação para todos os experimentos deste estudo. Já foi mostrado que as células com a mutação P253R apresentam aumento de afinidade aos FGFs e uma promiscuidade do FGFR2, assim como ocorre na S252W (Ibrahimi et al., 2004). Um estudo de Park (1995), numa análise comparativa de manifestações clínicas de pacientes com a mutação S252W e P253R, mostrou que não havia diferença nas características ósseas analisadas (incluindo craniossinostose e sindactilia de mãos e pés). Por outro lado, Slaney et al. (1996) mostraram que pacientes com a mutação P253R apresentam um fenótipo de sindactilia de pés e mãos mais graves, e pacientes com a mutação S252W apresentam fenda palatina mais grave. Outros estudos mais recentes mostraram que pacientes com a mutação P253R apresentaram um fenótipo mental mais grave e corroboram o estudo anterior de que estes pacientes

apresentam sindactilia mais grave. Há evidências de que pacientes portadores da mutação S252W apresentam craniossinostose mais agressiva (Lajeunie et al., 1999; von Gernet et al., 2000).

Após decidirmos a densidade celular para plaqueamento, a quantidade de soro a ser utilizada e a mutação a ser estudada, fizemos uma avaliação do crescimento e diferenciação das células mesenquimais periósticas humanas.

Num primeiro momento, avaliamos o crescimento das células normais e com a mutação P253R. Os resultados mostram que as células com a mutação P253R crescem significativamente mais do que as células normais até o 4º dia de cultura. Esses resultados corroboram os estudos de Ratisoontorn et al. (2003) que observaram que células ósseas da calvária de pintinhos com a mutação P253R também apresentavam aumento da proliferação celular. Fanganiello et al. (2007), no estudo com fibroblastos do periósteo com a mutação S252W, observaram, através da análise do perfil de expressão gênica por microarray, que o perfil de expressão gênica aumentada estavam predominantemente relacionados à proliferação celular. Já foi visto, também, um aumento na proliferação de células osteoblásticas imaturas (Mansukhani et al., 2000) e de osteoblastos de ossos longos (Yang et al., 2008) de camundongos com a mutação S252W. Outros estudos não mostraram alteração na proliferação celular (Lomri et al., 1998), ou apresentaram diminuição da proliferação. Fragale et al. (1999) utilizaram fragmentos ósseos da calvária de pacientes portadores da mutação P253R e observaram uma diminuição da taxa de proliferação celular. Yeh e colaboradores (2012) mostraram que células-tronco mesenquimais do periósteo da calvária de pacientes com a mutação S252W apresentavam um crescimento menor do que as células normais. Os efeitos dessas mutações em relação à proliferação apresentam ainda resultados contraditórios. Isso se deve ao fato de haver variações nas condições experimentais, tipo de célula utilizada e estágio de maturação da célula.

Para o experimento de avaliação do tratamento com T3 e/ou NH3 no crescimento celular, foi adicionado meio carenciado às células após 24 horas do plaqueamento. Após 24 horas em meio de carenciamento, o tratamento hormonal foi iniciado. Este foi considerado o dia zero de tratamento. As células foram, então, contadas nos dias 0, 1 e 4. Nessas condições, foram realizados experimentos para avaliarmos o ciclo de crescimento de células normais (provenientes de pacientes

sem doença óssea) e com a mutação P253R. Nas células normais, observamos que o T3 e/ou o NH3 não alteraram o crescimento das células. Nas células com a mutação P253R, o T3 foi capaz de aumentar em 25% o número de células em relação às células não tratadas no 4º dia de tratamento. A associação do NH3 com o T3 impediu a elevação significativa do número de células induzida pelo T3, enquanto que o NH3 sozinho praticamente não alterou o crescimento celular. Esses achados mostraram que as células mutadas são responsivas ao T3 e que o NH3 é capaz de limitar as ações do T3. Interessantemente, trabalhos anteriores mostraram que o T3 inibe a proliferação de células osteoblásticas (Beber et al., 2009; Gouveia et al., 2001; Varga et al., 1997; Williams et al., 1994). Neste trabalho, o T3 não alterou o crescimento das células normais, mas o fez em células com a mutação P253R. Sabe-se que o contato célula-célula, que acontece num estado de confluência, determina a diminuição da taxa de proliferação. Varga et al. (1999) viram que em células osteoblasto *like* MC3T3-E1 com 100% de confluência, o T3 não altera o número de células. Vimos, entretanto, que, nas células mutadas, o crescimento continuou em células 100% confluentes e ainda foi estimulado pelo T3.

Além do crescimento celular, avaliamos a diferenciação das células mesenquimais periósticas humanas em osteoblastos. A diferenciação osteogênica observada durante a ossificação intramembranosa envolve os seguintes processos: (1) proliferação celular, (2) migração-agregação celular e (3) diferenciação celular com a expressão dinâmica de fatores de transcrição osteogênicos e fatores de crescimento (Karner et al., 2009). Os estágios iniciais da diferenciação osteogênica são caracterizados, primeiramente, por uma proliferação celular, incluindo uma expressão aumentada de fosfatase alcalina (ALP), sendo esta essencial para a diferenciação dos osteoblastos e mediação da mineralização da matriz óssea e, consequentemente, a formação do tecido ósseo (Roberts et al., 2011). Portanto, a atividade da ALP é um marcador da atividade osteoblástica (Kasono et al., 1988; Sato et al., 1987). Nos estágios iniciais do processo de diferenciação celular, vimos que as células normais foram responsivas ao T3 e NH3. O T3 e NH3, isoladamente, aumentaram de forma significativa os níveis de ALP no dia 9 de diferenciação. A ação positiva no T3 na atividade da ALP já foi vista em estudos anteriores reportados na literatura (Kasono et al., 1988; Klaushofer et al., 1995), mostrando a ação positiva do T3 no processo de diferenciação osteoblástica. A associação de

ambos (T3+NH3) levou a um aumento dos níveis de fosfatase alcalina (ALP) significativamente menor do que aquele induzido pelo T3 sozinho. Já nas células com a mutação P253R, não houve alteração nos níveis de atividade da ALP com nenhum tratamento aplicado. É interessante observar que as células mutadas não tratadas (controles mutadas) apresentaram uma atividade da ALP maior do que as células normais não tratadas (controles normais). A atividade aumentada da ALP nas células tanto com a mutação P253R como com a S252W já foi citada anteriormente por outros autores (Fragale et al., 1999; Lomri et al., 1998; Yang et al., 2008; Yeh et al., 2012), sugerindo o aumento na maturação das células precursoras do tecido com mutações relacionadas à Síndrome de Apert.

Outras evidências de uma diferenciação osteoblástica acelerada foram observadas ao longo deste estudo. Qualitativamente, pudemos observar que, no período de 9 dias em meio de diferenciação osteoblástica, as células normais ainda não apresentavam alteração morfológica, enquanto que as células mutadas já apresentavam uma morfologia cubóide, o que é característico de osteoblastos (dados não mostrados). Além disso, o RUNX2, um fator de transcrição que ativa genes relacionados com a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, como osteocalcina, colágeno, osteopontina, apresentou uma expressão gênica aumentada em células com a mutação P253R comparadas às células normais. Park et al. (2001) mostraram a importância da ação do RUNX2 durante o processo de formação óssea intramembranosa, sendo sua expressão necessária para que ocorra todos os passos da diferenciação osteoblástica. Além disso, nossos achados corroboram outros estudos onde foi visto que as mutações S252W e P253R aumentaram a expressão de RUNX2 em osteoblastos da calvária humana de pacientes com Síndrome de Apert (Tanimoto et al., 2004; Baroni et al., 2005). Além do aumento da expressão do RUNX2, observamos uma diminuição da expressão gênica da osteocalcina. Lomri e colaboradores (1998) mostraram um aumento na expressão do mRNA da osteocalcina em células da calvária de pacientes com Síndrome de Apert. Yeh et al. (2011) mostraram uma variação dos níveis da osteocalcina dependendo do estágio da diferenciação das células-tronco mesenquimais com a mutação S252W. Viram nas semanas 2 e 3 de cultura uma expressão gênica mínima da osteocalcina. Além dos resultados de Yeh et al. (2011), nossos resultados corroboram os resultados de Baroni et al. (2005), que relataram

uma diminuição da expressão da osteocalcina em células osteoblásticas humanas provenientes do osso parietal próximo à sutura coronal de pacientes portadores da mutação P253R. É importante salientar que Baroni também encontrou uma expressão aumentada de RUNX2 nas células mutadas, mas diferente do que se esperava, os níveis de osteocalcina estavam diminuídos. Essa diferença foi explicada por um aumento maior da isoforma P1 do RUNX2 (P1/MASNS), a qual se expressa quando as células precursoras se comprometem com o fenótipo osteoblástico e em períodos tardios da diferenciação osteoblástica, do que com a isoforma P2 (P2/MRIPV), a qual é expressa em células precursoras mesenquimais (Banerjee et al., 2001; Baroni et al., 2005). Esse diferente modelo de transcrição do RUNX2 em células Apert poderia levar à uma regulação negativa da expressão do mRNA da osteocalcina e, consequentemente, ao diferente fenótipo observado em células Apert (Baroni et al., 2005). A diferenciação osteoblástica mais precoce e com aumento da expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica em células mesenquimais C3H10T1/2 derivadas de camundongos, com transfecção estável do FGFR2 com a mutação S252W também foi encontrada nos estudos de Miraoui et al. (2009). Além disso, esses estudos mostraram também que o aumento da expressão gênica do FGFR2 em células osteoblásticas mais maduras – MC3T3-E1 derivadas da calvária – indicam que esse receptor pode ativar a diferenciação osteoblástica em diferentes estágios da maturação celular (Miraoui et al., 2009). Em células humanas portadoras da mutação no FGFR2, viu-se um aumento no número de células precursoras que se comprometem com a via osteogênica e que, por fim, levam a um aumento da formação da matriz óssea subperiosteal e à ossificação prematura da calvária durante o desenvolvimento fetal (Lomri et al., 1998). No presente estudo, observamos aumento significativo da expressão gênica do FGFR2 nas células com a mutação P253R comparada com a célula normal. Baroni e colaboradores (2005) não encontraram aumento da expressão gênica do FGFR2, mas encontraram uma maior expressão proteica desse receptor em osteoblastos do osso parietal de humanos portadores da mutação P253R. O aumento da expressão proteica do FGFR2 é inesperado, uma vez que a ativação do receptor resulta numa rápida endocitose e degradação do complexo ligante receptor (Schlessinger, 2000).

Nas células mutadas, onde há um aumento da ligação do ligante e maior tempo de resposta da ativação do receptor, a internalização do receptor seria a

resposta mais esperada. É possível que, nas células mutadas, possa haver algum mecanismo defeituoso de internalização do FGFR2 ou anormalidades a nível pós transcricional e transcricional.

A formação de nódulos de mineralização (depósitos de cálcio) reflete a presença de osteoblastos maduros. Assim sendo, a avaliação da formação desses nódulos nos dá uma ideia do estágio de diferenciação osteoblástica. Observamos uma formação de nódulos de mineralização mais significativa aos 6, 9, 14 e 21 dias de cultura em células com a mutação P253R. Isso mostra que a mutação leva a uma aceleração importante da diferenciação osteoblástica e/ou a uma maior atividade dos osteoblastos. A avaliação da ação do T3 e/ou NH3 na formação de nódulos de mineralização mostrou que o T3 induziu de forma importante a formação desses nódulos no dia 21 de cultura em células normais. Isso está de acordo com estudos com osteoblastos de roedores que demonstram que o T3 estimula a diferenciação osteoblástica (Beber et al., 2009; Varga et al., 1997; Williams et al., 1994). Por outro lado, observamos que o antagonista do hormônio tireoideano, o NH3, não alterou a formação dos nódulos. Interessantemente, observamos que o NH3 bloqueou a ação indutora do T3 na diferenciação osteoblástica, mantendo os níveis de depósitos de cálcio parecidos com aqueles das células sem tratamento aos 21 dias. Em adição à ação positiva do T3 na formação dos nódulos de mineralização, observamos um aumento na expressão do mRNA do RUNX2 causada pelo tratamento com T3, mostrando uma maior maturação osteoblástica. O NH3, mais uma vez, bloqueou a ação do T3. Isso mostra que o NH3 é capaz de exercer uma ação antagonista nas células mesenquimais periósticas humanas sem doenças ósseas, de forma similar à observada em outros sistemas (Grover et al., 2007). Esses resultados são interessantes devido à ação positiva do T3 no processo de diferenciação osteoblástica das células mesenquimais e ao efeito bloqueador do NH3 sobre o T3 nessas células ósseas.

É digno de nota que, nas células com a mutação P253R, o T3 não foi capaz de induzir aumento dos nódulos de mineralização. É importante lembrar que as células mutadas não tratadas (mutadas controles) já apresentam uma maior formação dos nódulos de mineralização quando comparadas às células normais não tratadas (normais controles), o que sugere que a mutação aumente a diferenciação e/ou atividade osteoblástica, como discutido acima. Assim sendo, nessas células, o

T3 não foi capaz de estimular ainda mais a diferenciação e/ou atividade osteoblástica. Isso sugere que o T3 possa atuar através da mesma via utilizada pelo FGFR2 para ativar a diferenciação osteoblástica. Acreditamos que, como a mutação (neste caso, com ganho de função) já está ativando esta via, o T3 não promove uma resposta.

Por outro lado, foi interessante observar que, nas células mutadas, o NH3 sozinho ou associado ao T3 (NH3+T3) bloqueou e até mesmo reduziu a formação dos nódulos de mineralização para níveis significativamente menores do que aquele das células controle aos 21 dias (células mutadas não tratadas). Isto não indica uma atividade de antagonista, mas sim, uma atividade de agonista inverso. Agonista inverso pode ser definido como aquele ligante que se liga a um receptor como um agonista, mas induz uma resposta farmacológica oposta a do agonista (Rang et al., 2003). Um pré-requisito para uma resposta agonista inversa é que o receptor deve ter um nível de atividade constitutiva basal (intrínseca) na falta do ligante, o que é característico dos TRs, como será explicado abaixo (Rang et al., 2003).

Sabe-se que os receptores de hormônio tireoideano (TRs) possuem uma ação ativadora ou supressora da transcrição gênica independente da ligação ao ligante, o T3 (Hörlein et al., 1995). Os TRs não ligados ao ligante interagem com os seus elementos responsivos (TREs), nos promotores dos seus genes alvo, recrutando co-ativadores ou co-repressores da transcrição gênica. Ou seja, como alguns outros receptores nucleares, os TRs ligam-se aos TREs na ausência do ligante (T3), e têm ações independentes do T3. Em células de mamíferos, a ligação de TRs a TREs positivos recruta co-repressores levando à supressão da atividade basal do promotor (Brent et al., 1989). A ligação do T3 ao TR reverte a supressão através da liberação dos co-repressores e recrutamento de co-ativadores, o que resulta na indução da transcrição gênica a níveis que podem ser ainda maiores do que aqueles do estado basal. Por outro lado, a atividade basal de promotores que contém TREs negativos é estimulada por receptores não ligados e a transcrição é reprimida após a ligação do T3 (Hollenberg et al., 1995; Tagami e Jameson, 1998). Há evidências de que a associação do T3 ao TR em promotores positivos induz mudanças conformacionais do receptor que resultam na dissociação do complexo repressor e permite o recrutamento de co-ativadores, sendo que o contrário aconteceria em promotores negativos. Assim sendo, o hormônio tireoideano

basicamente atua no sentido de converter o TR (não ligado) de um repressor a um ativador, ou vice versa, da transcrição gênica.

Considerando-se que o NH3 suprimiu o processo de diferenciação osteoblástica nas células mutadas aos 21 dias, uma resposta que foi contrária à resposta do T3 em células normais, podemos pensar nesta hipótese de ação de agonista inverso. Essas observações sugerem que a interação NH3-TR não só impediu a ligação T3-TR como também promoveu uma alteração conformacional diferenciada do TR levando, também, a uma associação de cofatores (co-repressores ou co-ativadores) diferenciada nos genes alvo do T3.

Estudos recentes mostram que há várias razões para se suspeitar que o NH3 não atuará sempre com um antagonista puro do T3. Mostrou-se, por exemplo, que o NH3 pode atuar como um agonista fraco quando administrado em altas doses (Lim et al., 2002; Grover et al., 2007). Além disso, há evidências de que o NH3 tem ações complexas nos promotores de genes alvo do T3 em diferentes linhagens celulares. Um estudo recente de Shah et al. (2008) mostrou que o NH3 bloqueia interações do TR com co-ativadores e co-repressores e, também, inibe, em transfecções, a atividade do AF-1 e AF-2 (*activation function* 1 e 2, respectivamente), que são superfícies de ligação para co-ativadores nos TRs. Viu-se, ainda, que enquanto o NH3 não apresenta atividade agonista em genes ativados pelo T3 nas células hipofisárias GC, ele ativa o spot 14 (S14) nas células do fígado HTC, com aumento da acetilação da histona H4 e recrutamento de co-ativadores no promotor do S14.

Surpreendentemente, viu-se que o T3 promove recrutamento de co-repressores nesse promotor. Além disso, mostrou-se que os efeitos do NH3 podem variar. Shah et al. (2008) observaram recrutamento do co-repressor N-Cor (*nuclear receptor corepressor*) no promotor do S14 em células GC e liberação e religação de N-Cor no mesmo promotor em células HTC. Assim sendo, nota-se que as ações do NH3 são dependentes do tipo celular e do promotor. Esses estudos sugerem, ainda, que o NH3 geralmente atua como um antagonista através do bloqueio de AF-1 e AF-2, mas que efeitos complexos no recrutamento de co-reguladores podem resultar em efeitos agonistas parciais, que são independentes do bloqueio da interação T3-TR.

Como já foi comentado, o presente estudo sugere que o NH3 possa atuar como um agonista inverso nas células-tronco mesenquimais periósticas humanas. Essa hipótese só poderá ser confirmada através de estudos *in vitro*, utilizando-se

transfecções transientes, para avaliar os efeitos do NH3 na ativação do TR e no recrutamento de co-reguladores.

Em sumário, os achados deste estudo mostram que as células mesenquimais periósticas humanas portadoras da mutação P253R apresentam diferenciação osteoblástica acelerada e que essas células são responsivas ao T3 e ao seu antagonista NH3. Quanto ao crescimento celular, pudemos observar que o T3 e NH3 não tiveram efeito nas células normais; entretanto, nas células mutadas, o T3 estimulou o crescimento, enquanto que o NH3 bloqueou a ação do T3, mas não teve efeito, quando administrado isoladamente. Quanto à diferenciação osteoblástica das células normais, vimos que o T3 estimula esse processo e que o NH3 novamente bloqueia essa ação do hormônio tireoideano. Já nas células mutadas, o T3 não estimula a diferenciação celular, enquanto o NH3 bloqueia esse processo. Em conclusão, esses achados sugerem que o aprofundamento e maior entendimento da via do hormônio tireoideano em células mesenquimais periósticas humanas pode contribuir para o desenvolvimento de recursos terapêuticos para o tratamento de pacientes com a Síndrome de Apert. Essa potencialidade torna-se mais evidente quando consideramos que o hormônio tireoideano estimula a diferenciação osteoblástica e que o excesso de hormônio tireoideano pode levar à craniossinostose, enquanto que a sua deficiência pode levar a atraso na ossificação do esqueleto, incluindo o crânio. Assim sendo, o achado inédito de que o NH3 limita a diferenciação de células mesenquimais periósticas humanas em osteoblastos traz novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas que podem auxiliar no tratamento de doenças relacionadas à ossificação anormal e, até mesmo, minimizar a necessidade de cirurgias para pacientes com craniossinotoses.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, as células mesenquimais periósticas humanas são responsivas ao T3 e ao seu antagonista NH3. O fato do T3 estimular a diferenciação osteoblástica em células normais, mas não nas células portadoras da mutação P253R, que apresentam diferenciação osteoblástica exacerbada devido à alterações no FGFR2, sugere que vias de sinalização do T3 e FGF sejam comuns. Essa hipótese é reforçada pelo fato do NH3 bloquear a diferenciação osteoblástica exacerbada em células portadoras da mutação P253R. Esses achados sugerem que antagonistas ou agonistas do T3 tem o potencial de serem utilizados como ferramentas farmacológicas no tratamento de doenças relacionadas à ossificação anormal.

REFERÊNCIAS*

Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. Bone. 1997;21(2):137-42.

Allain TJ, McGregor AM. Thyroid hormones and bone. J Endocrinol. 1993;139(1):9-18.

Arnold LA, Estebanez-Perpina E, Togashi M, Jouravel N, Shelat A, McReynolds AC, Mar E, Nguyen P, Baxter JD, Fletterick RJ, Webb P, Guy RK. Discovery of small molecule inhibitors of the interaction of the thyroid hormone receptor with transcriptional coregulators. J Biol Chem. 2005;280(52):43048-55.

Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. Endocrinology. 2001;142(9):4026-39.

Barnard JC, Williams AJ, Rabier B, Chassande O, Samarut J, Cheng S-Y, Duncan Bassett JH, Williams GR. Thyroid Hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis. Endocrinology Dec. 2005;146(12):5568-80.

Baroni T, Carinci P, Lolli C, Belluci C, Aisa MC, Scapoli L, Carinci F, Pezzetti F, Calvitti M, Farina A, Conte C, Bodo M. P253R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. J Cell Physiol. 2005;202(2):524-35.

Bassett JH, Swinhoe R, Chassande O, Samarut J, Williams GR. Thyroid hormone regulates heparin sulfate proteoglycan expression in the growth plate. Endocrinology. 2006;147(1):295-305.

Bassett JH, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. Trends Endocrinol Metab. 2003;14(8):356-64.

Baxter JD, Webb P, Grover G, Scanlan TS. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. Trends Endocrinol Metab. 2004;15(4):154-7.

Beber EH, Capelo LP, Fonseca TL, Costa CC, Lotfi CF, Scanlan TS, Gouveia CH. The thyroid hormone receptor (TR) beta-selective agonist GC-1 inhibits proliferation but induces differentiation and TR beta mRNA expression in mouse and rat osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int. 2009;84(4):324-33.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(3):235-53.

Brent GA, Larsen PR, Harney JW, Koenig RJ, Moore DD. Functional characterization of the rat growth hormone promoter elements required for induction by thyroid hormone with and without a co-transfected beta type thyroid hormone receptor. J Biol Chem. 1989;264(1):178-82.

Capelo LP, Beber EH, Fonseca TL, Gouveia CH. The monocarboxylate transporter 8 and L-type amino acid transporters 1 and 2 are expressed in mouse skeletons and in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Thyroid. 2009;19(2):171-80.

Capelo LP, Beber EH, Huang SA, Zorn TM, Bianco AC, Gouveia CH. Deiodinase-mediated thyroid hormone inactivation minimizes thyroid hormone signaling in the early development of fetal skeleton. Bone. 2008;43(5):921-30.

Castro-Silva II, Zambuzzi WF, de Oliveira Castro L, Granjeiro JM. Periosteal-derived cells for bone bioengineering: a promising candidate. Clin Oral Implants Res. 2012;23(10):1238-42.

Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. Mol Endocrinol. 1997;11(9)**:**1278-90.

Cohen MM Jr. An etiologic and nosologic overview of craniosynostosis syndromes. Birth Defects Orig Artic Ser. 1975;11(2)**:**137-89.

Cohen MM Jr. Editorial: Perspectives on Craniosynostosis. American Journal of Medical Genetics. 2005;136A(4)**:**313-26.

Cohen MM Jr., Kreiborg S, Lammer EJ, Cordero JF, Mastroiacovo P, Erickson JD, Roeper P, Martinez-Frias ML. Birth prevalence study of the Apert syndrome. Am J Med Genet. 1992;42(5)**:**655-9.

Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. J Bone Min Res. 2009;24(2):274-82.

De Luca F, Baron J. Control of Bone Growth by Fibroblast Growth Factors. Trends Endocrinol Metab. 1999;10(2)**:**61-5.

Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. Endocr Rev. 1984;5(2)**:**151-84.

Eswarakumar VP, Ozcan F, Lew ED, Bae JH, Tome F, Booth CJ, Adams DJ, Lax I, Schlessinger J. Attenuation of signaling pathways stimulated by pathologically activated FGF-receptor 2 mutants prevents craniosynostosis. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(49)**:**18603-8.

Fanganiello RD, Sertie AL, Reis EM, Yeh E, Oliveira NA, Bueno DF, Kerkis I, Alonso N, Cavalheiro S, Matsushita H, Freitas R, Verjovski-Almeida S, Passos-Bueno MR. Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. Mol Med. 2007;13(7-8)**:**422-42.

Fragale A, Tartaglia M, Bernardini S, Di Stasi AM, Di Rocco C, Velardi F, Teti A, Battaglia PA, Migliaccio S. Decreased proliferation and altered differentiation in osteoblasts from genetically and clinically distinct craniosynostotic disorders. Am J Pathol. 1999;154(5):1465-77.

Freitas FR, Capelo LP, O'Shea PJ, Jorgetti V, Moriscot AS, Scanlan TS, Williams GR, Zorn TM, Gouveia CH. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. J Bone Miner Res. 2005;20(2)**:**294-304.

Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, Brent GA, Bianco AC, Gouveia CH. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR beta-selective compound GC-1. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285(5)**:**E1135-41.

Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. FASEB J. 1992;6(15):3362-9.

Goriely A, McVean GA, Rojmir M, Ingemarsson B, Wilkie AOM. Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. Science. 2003;301(5633):643-6.

Gouveia CH, Schultz JJ, Bianco AC, Brent GA. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. J Endocrinol. 2001;170(3)**:**667-75.

Grover GJ, Dunn C, Nguyen NH, Boulet J, Dong G, Domogauer J, Barbounis P, Scanlan TS. Pharmacological profile of the thyroid hormone receptor antagonist NH3 in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322(1)**:**385-90.

Grover GJ, Egan DM, Sleph PG, Beehler BC, Chiellini G, Nguyen NH, Baxter JD, Scanlan TS. Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. Endocrinology. 2004;145(4)**:**1656-61.

Hehr U, Muenke M. Craniosynostosis syndromes: from genes to premature fusion of skull bones. Mol Genet Metab. 1999;68(2)**:**139-51.

Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE. Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. J Biol Chem. 1995;270(24):14275-80.

Holmes G, Basilico C. Mesodermal expression of Fgfr2^{S252W} is necessary and sufficient to induce craniosynostosis in a mouse model of Apert syndrome. Dev Biol. 2012;368(2):283-93.

Hopper RA, Zhang JR, ourasier VL, Morova-Protzner I, Protzner KF, Pang CY, Forrest CR. Effect of isolation of periosteum and dura on the healing of rabbit calvarial inlay bone grafts. Plast Reconstr Surg. 2001;107(2):454-62.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature. 1995;377(6548):397-404.

Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM, Mohammadi M. Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(13)**:**7182-7.

Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, Itoh N, Linhardt RJ, Mohammadi M. Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. Hum Mol genet. 2004;13(19):2313-24.

Iseki S, Wilkie AO, Heath JK, Ishimaru T, Eto K, Morris-Kay GM. Fgfg2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. Development. 1997;124(17):3375-84.

Jaslow CR. Mechanical properties of cranial sutures. J Biomech. 1990;23(4):313-21.

Jodar E, Begona Lopez M, Garcia L, Rigopoulou D, Martinez G, Hawkins F. Bone changes in pre- and postmenopausal women with thyroid cancer on levothyroxine therapy: evolution of axial and appendicular bone mass. Osteoporos Int. 1998;8(4)**:**311-6.

Johnson D, Wilkie AOM. Craniosynostosis, Eur J Hum Genet. 2011;19(4):369-76.

Kärner E, Bäckesjö CM, Cedervall J, Sugars RV, Ahrlund-Richter L, Wendel M. Dynamics of gene expression during bone matrix formation in osteogenic cultures de rived from human embryonic stem cells in vitro. Biochim Biophys Acta. 2009;1790(2):110-18.

Kasono K, Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1): a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. Bone Miner. 1988;4(4):355-63.

Katz D, Lazar MA. Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes. J Biol Chem. 1993;268(28)**:**20904-10.

Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. BMC Cell Biol. 2001;2:5.

Kim HJ, Kim JH, Bae SC, Choi JY, Kim HJ, Ryoo HM. The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. J Biol Chem. 2003;278(1):319-26.

Klaushofer K, Vaarga F, Glantschnig H, Fratzl-Zelman N, Czerwenka E, Leis HJ, Koller K, Peterlik M. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. J Nutr. 1995;125(7 Suppl):1996S-2003S.

Lajeunie E, Cameron R, El Ghouzzi V, de Parseval N, Journeau P, Gonzales M, Delezoide AL, Bonaventure J, Le Merrer M, Renier D. Clinical variability in patients with Apert's syndrome. J Neurosurg. 1999;90(3):443-7.

Lee JT, Jr., McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. Leukemia. 2002;16(4):486-507.

Lehmke J, Bogner U, Felsenberg D, Peters H, Schleusener H. Determination of bone mineral density by quantitative computed tomography and single photon absorptiometry in subclinical hyperthyroidism: a risk of early osteopaenia in post-menopausal women. Clin Endocrinol (Oxf). 1992;36(5):511-17.

Lemonnier J, Delannoy P, Hott M, Lomri A, Modrowski D, Marie PJ. The Ser252Trp fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2) mutation induces PKC-independent downregulation of FGFR-2 associated with premature calvaria osteoblast differentiation. Exp Cell Res. 2000;256(1):158-67.

Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2004;14(1-2):1-41.

Lim W, Nguyen NH, Yang HY, Scanlan TS, Furlow JD. A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo. J Biol Chem. 2002;277(38):35664-70.

Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, Sangiorgi F, Snead ML, Maxson RE. Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX-2-mediated craniosynostosis in humans. Dev Biol. 1999;205(2):260-74.

Livak K. ABI Prism 7700 Sequence Detection System User Bulletin 2. PE Applied Biosystems. 1997.

Lomri A, Lemonnier J, Hott M, de Parseval N, Lajeunie E, Munnich A, Renier D, Marie PJ. Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. J Clin Invest. 1998;101(6):1310-7.

Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(1):46-56.

Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. Signaling by fibroblast growt factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. J Cell Biol. 2000;149(6):1297-308.

Manzano J, Morte B, Scanlan TS, Bernal J. Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. Endocrinology. 2003;144(12):5480-7.

Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. Gene. 2003;316:23-32.

Milne M, Kang MI, Quail JM, Baran DT. Thyroid hormone excess increases insulin-like growth factor I transcripts in bone marrow cell cultures: divergent effects on vertebral and femoral cell cultures. Endocrinology. 1998;139(5):2527-34.

Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie PJ. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. J Biol Chem. 2009;284(8):4897-4904.

Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(2):107-37.

Morris-Kay GM, Wilkie AOM. Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. J Anat. 2005;207(5):637-653.

Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Schwartz Sorensen N. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. Acta Endocrinol (Copenh). 1977;85(3):515-25.

Morris-Kay GM, Wilkie AOM. Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. J Anat. 2005;207(5): 637-653.

Nguyen NH, Apriletti JW, Baxter JD, Scanlan TS. Hammett analysis of selective thyroid hormone receptor modulators reveals structural and electronic requirements for hormone antagonists. J Am Chem Soc. 2005;127(13):4599-608.

Ogle RC, Tholpady SS, McGlynn KA, Ogle RA. Regulation of Cranial Suture Morphogenesis. Cells Tissues Organs. 2004;176(1-3):54-6.

Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SR, Johnson D, Wall SA, Jiang W, Theda C, Jabs EW, Wilkie AO. De novo alu-element

insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. Am J Hum Genet. 1999;64(2):446-61.

Olsen SK, Garbi M, Zampieri N, Eliseenkova AV, Ornitz DM, Goldfarb M, Mohammadi M. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. J Biol Chem. 2003;278(36):34226-36.

Opperman LA, Sweeney TM, Redmon J, Persing JA, Ogle RC. Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures. Dev Dyn. 1993;198(4):3112-22.

Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. Dev Dyn. 2000;219(4):472-485.

Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. Bioessays. 2000;22(2):108-12.

Ornitz DM, Itoh N 2001 Fibroblast growth factors. Genome Biol. 2001;2(3):reviews3005.1-12.

Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. Genes Dev. 2002;16(12):1446-65.

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The Journal of Biological Chemistry. 1996;271(25):15292-7.

Park WJ, Theda C, Maestri NE, Meyers GA, Fryburg JS, Dufresne C, Cohen MM Jr, Jabs EW. Analysis of phenotypic features and FGFR2 mutations in Apert Syndrome. Am J Hum Genet. 1995;57(2):321-8.

Park MH, Shin HI, Choi JY, Nam SH, Kim YJ, Kim HJ, Ryoo HM. Differential expression patterns of Runx2 isoforms in cranial suture morphogenesis. J Bone Miner Res. 2001;16(5):885-92.

Passos-Bueno MR, Sertie AL, Richieri-Costa A, Alonso LG, Zatz M, Alonso N, Brunoni D, Ribeiro SF. Description of a new mutation and characterization of FGFR1, FGFR2, and FGFR3 mutations among Brazilian patients with syndromic craniosynostoses. Am J Med Genet. 1998;78(3):237-41.

Passos-Bueno MR, Sertie AL, Zatz M, Richieri-Costa A. Pfeiffer mutation in an Apert patient: how wide is the spectrum of variability due to mutations in the FGFR2 gene? Am J Med Genet. 1997;71(2):243-5.

Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparin sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. Science. 1991;252(5013):1705-8.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK Farmacologia 5ª Ed. São Paulo: Elsevier, 2003.

Ratinsoontorn C, Fan GF, McEntee K, Nah HD. Activating (P253R, C278F) and dominante negative mutations of FGFR2: differential effects on calvarial bone cell proliferation, differentiation, and mineralization. Connect Tissue Res. 2003;44 (Suppl 1):292-7.

Roberts SJ, Chen Y, Moesen M, Schrooten J, Luyten FP. Enhancement of osteogenic gene expression for the differentiation of human periosteal derived cells. Stem Cell Res. 2011;7(2):137-144.

Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. Endocrinology. 2000;141(10)**:**3887-97.

Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblástica cells (ROS17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. Endocrinology. 1987;120(5):1873-81.

Schlessinger J. Cell Signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2000;103(2):211-25.

Segni M, Leonardi E, Mazzoncini B, Pucarelli I, Pasquino AM. Special features of Graves' disease in early childhood. Thyroid. 1999;9(9)**:**871-7.

Shah V, Nquyen P, Nquuen NH, Togashi M, Scanlan TS, Baxter JD, Webb P. Complex actions of thyroid hormone receptor antagonist NH-3 on gene promoters in different cell lines. Mol Cell Endocrinol. 2008;296(1-2):69-77.

Shukla V, Coumoul X, Wang RH, Kim HS, Deng CX. RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. Nat Genet. 2007;39(9)**:**1145-50.

Slaney SF, Oldridge M, Hurst JA, Mosrris-Kay GM, Hall CM, Poole MD, Wilkie AO. Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. Am J Hum Genet. 1996;58(5):923-32.

Sobotta J. Atlas de Anatomia 20ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, vol I, 1993.

Stevens DA, Harvey CB, Scott AJ, O'Shea PJ, Barnard JC, Williams AJ, Brady G, Samarut J, Chassande O, Williams GR. Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone. Mol Endocrinol. 2003;17(9)**:**1751-66.

Tagami T, Jameson JL. Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. Endocrinology. 1998;139(2):640-50.

Tamburrini G, Caldarelli M, Massimi L, Santini P, Di Rocco C. Intracranial pressure monitoring in children with single suture and complex craniosynostosis: a review. Childs Nerv Syst. 2005;21(10)**:**913-21.

Tanimoto Y, Yokoseki M, Hiura K, Matsumoto K, Nakanishi H, Matsumoto T, Marie PJ, Moriyama K. A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S252W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblástica differentiation caused by FGFR2 activation in Apert syndrome. J Biol Chem. 2004;279(4):45926-34.

Tsai FJ, Hwu WL, Lin SP, Chang JG, Wang TR, Tsai CH. Two common mutations 934C to G and 937C to G of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene in Chinese patients with Apert syndrome. Hum Mutat. 1998;Suppl 1:S18-9.

Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS, Dillmann WH. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. Endocrinology. 2000;141(9)**:**3057-64.

Umemori H, Linhoff MW, Ornitz DM, Sanes JR. FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. Cell. 2004;118(2):257-70.

Varga F, Rumpler M, Luegmayr E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression. Calcif Tissue Int. 1997;61(5):404-411.

Varga F, Luegmayr E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Ellinger A, Prinz D, Rumpler M, Klaushofer K. Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis. J Endocrinol. 1999;160(1):57-65.

Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, Ribeiro MO, Bianco AC, Gouveia CH 2007 Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. J Endocrinol **193**(1)**:**21-9.

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 F, Kan M, Xy J, McKeehan WL. Alternately spliced NH2-terminal immunoglobulin-like Loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. J Biol Chem. 1995;270(17):10231-5.

Warren SM, Longaker MT. The pathogenesis of craniosynostosis in the fetus. Yonsei Med J. 2001;42(6):646-59.

White P, Burton KA, Fowden AL, Dauncey MJ. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. Faseb J. 2001;15(8):1367-76.

Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. Nat Genet. 1995;9(2):165-72.

Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. Nat Rev Genet. 2001;2(6):458-68.

Williams AJ, O'Shea PJ, Williams GR. Complex interactions between thyroid hormone and fibroblast growth factor signalling. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2007;14(5):410-5.

Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3 and retinoid signaling. Endocrinology. 1994;135(6):2375-2385.

Xu J, Kogai T, Brent GA, Hershman JM. A GC box in the human sodium iodide symporter gene promoter is essential for full activity. Thyroid. 2002;12(2):107-14.

Yang F, Wang Y, Hsu B, Jabs EW, Elisseeff JH. The study of abnormal bone development in the Apert syndrome Fgfr2+/S252W mouse using a 3D hydrogel culture model. Bone. 2008;43(1):55-63.

Yeh E. Estudo da contribuição molecular e celular do periósteo na craniossinostose da síndrome de Apert. 204f. [tese (Doutorado em Ciências, na Área de Biologia/Genética)]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2011.

Yeh E, Atique R, Ishiy FA, Fanganiello RD, Alonso N, Matushita H, da Rocha KM, Passos-Bueno MR. FGFR2 mutation confers a less drastic gaiin of funtion in mesenchymal stem cells than in fibroblasts. Stem Cell Rev. 2012;8(3):685-95.

Yeh E, Fanganiello RD, Sunaga DY, Zhou X, Holmes G, Rocha KM, Alonso N, Matushita H, Wang Y, Jabs EW, Passos-Bueno MR. Novel molecular pathways elicited by mutant FGFR2 may account for brain abnormalities in Apert syndrome. PloS One. 2013;8(4):e60439.

Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. Thyroid Hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. Mol Cell Endocrinol. 2006;246(1-2):121-127.

Yin L, Du X, Li C, Xu X, Chen Z, Su N, Zhao L, Qi H, Li F, Xue J, Yang J, Jin M, Deng, Chen L. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2)

causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chodrogenesis and osteogenesis. Bone. 2008;42(4):631-43.

Yu K, Herr AB, Waksman G, Ornitz DM. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(26):14536-41.