

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

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 6^o até o 21^o 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 perióstio 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 osteoblástica, 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-function 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 mutated 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.

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).

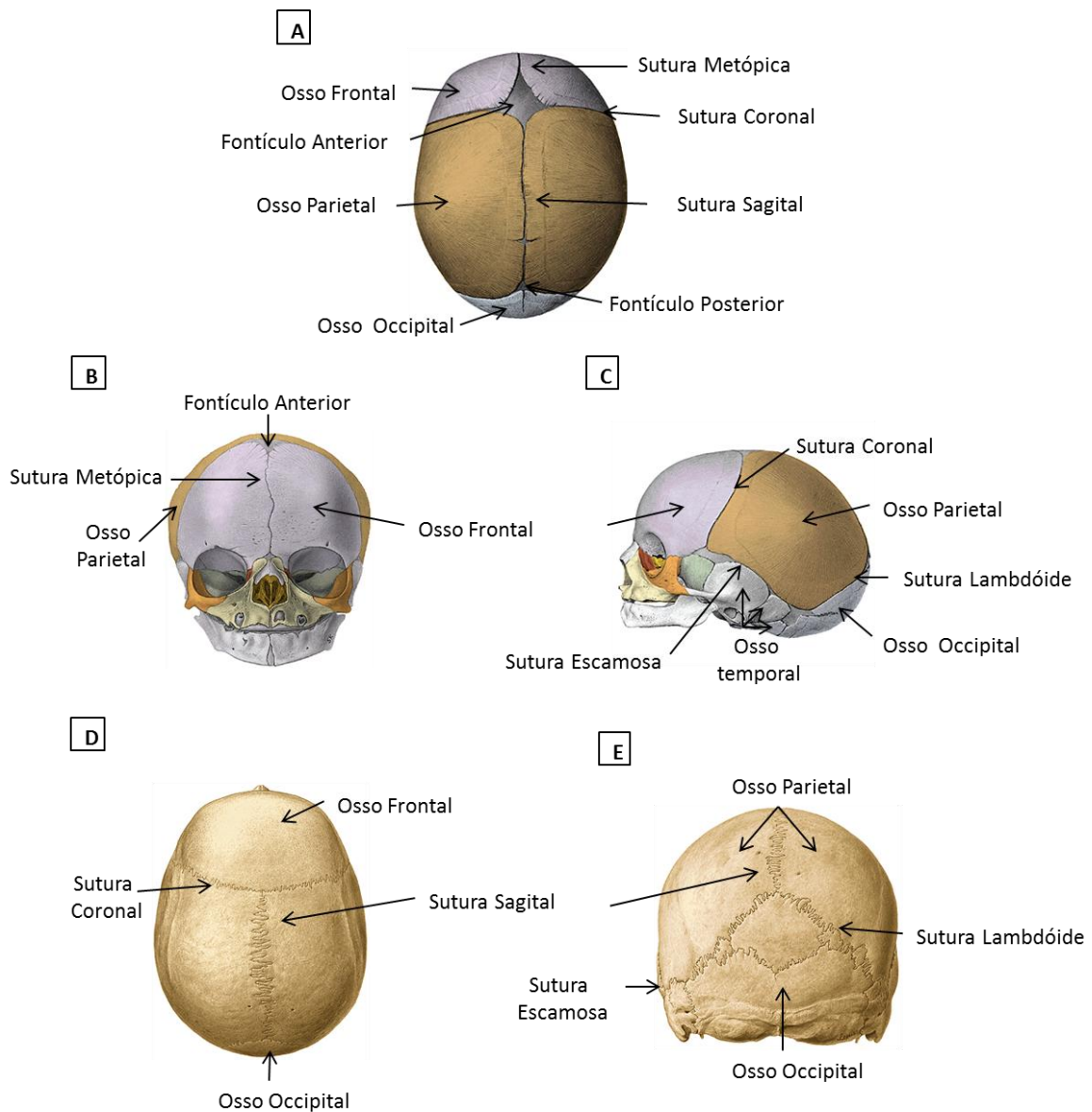


Figura 1: Ossos e suturas do crânio. Vista **(A)** Superior, **(B)** Anterior e **(C)** Lateral do crânio de um recém-nascido, e Vista **(D)** superior e **(E)** Posterior de um crânio de um adulto [Sobotta, 1993].

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 mantêm 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).

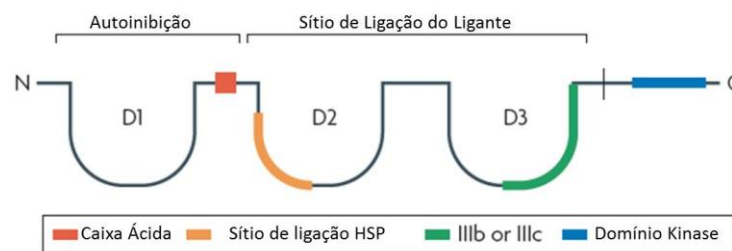


Figura 2: Características estruturais dos receptores de fatores de crescimento fibroblásticos (FGFRs). [Adaptado de Beenken, Mohammadi, 2009].

Os FGFRs utilizam três principais vias de segundos mensageiros: fosfolipase C- γ (PLC γ), 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 (Coll), 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 TR β 1, TR β 2, TR α 1 e TR α 2. Essa última isoforma não se liga ao T3 e funciona, pelo menos *in vitro*, como um antagonista do TR α 1 e TR β 1 (Katz, Lazar, 1993). O TR α 1, TR α 2 e TR β 1 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 desidases 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 desidases 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 TR β , o GC-1, inibem a proliferação e estimulam a diferenciação osteoblástica de maneira similar, o que sugere que o TR β 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 TR α ou TR β 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 TR β no tecido ósseo e em células osteoblásticas, utilizando o análogo seletivo pelo TR β , 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. Bassett 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 TR α (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 TR α . 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?

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, Heinzl 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 derived 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, Fratzi-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 growth 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* 5^a 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 osteoblastic 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, Nguyen P, Nquyen 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, Mosrri-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* 20^a 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 osteoblastic 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, Fratzi-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, Fratzi-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 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 gain of function 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 chondrogenesis 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.