

Thais Fernanda Moreira

**Caracterização de cultura primária de células gengivais de
pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C***

Brasília
2018

Thais Fernanda Moreira

Caracterização de cultura primária de células gengivais de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe

Co-orientador: Dra. Bruna Rabelo Amorim

Brasília
2018

À minha família, meu refúgio e porto seguro. Aos meus
professores, que transformam pedras brutas em jóias.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por ter permitido que eu cruzasse o caminho de pessoas tão queridas e especiais durante minha caminhada. Aos meus pais, Lídia e Nivaldo, pelo apoio, exemplo e amor incondicional. Meus padrinhos, Vivi e Gilson, pelo refúgio, incentivo e paciência. A minha vó Mêrces, pela força e pelo preciosismo que sempre deu à educação. Às minhas orientadoras Bruna e Ana Carolina, pela resignação, ajuda e confiança. Aos meus amigos e namorado por partilharem parte de suas histórias e por fazerem parte das minhas histórias.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Oliver Wendell Homes

MOREIRA, Thais Fernanda. Caracterização de cultura primária de células gengivais de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C*. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A família de quinases denominada “*family with sequence similarity 20*” compreende 3 proteínas (*FAM20A*, *FAM20B* e *FAM20C*) dentre elas, as *FAM20A* e *FAM20C* que são essenciais no controle da biomineralização. Mutações recessivas em seus respectivos genes resultam nas síndromes conhecidas como Síndrome de Raine (RNS; OMIM #259775) e Síndrome Esmalte-Renal (ERS; OMIM #204690). A RNS, causada por mutações no gene *FAM20C* é uma rara desordem hereditária caracterizada principalmente por esclerose óssea generalizada, anomalias craniofaciais e calcificações ectópicas. Além das alterações no metabolismo ósseo, os pacientes que sobrevivem à infância apresentam amelogênese imperfeita, defeitos na mineralização da dentina, fibromatose gengival e calcificações ectópicas gengivais. A ERS, causada por mutações no gene *FAM20A*, é caracterizada pela presença de nefrocalcinose e manifestações bucais que incluem amelogênese imperfeita hipoplásica, fibromatose gengival, calcificações ectópicas em gengiva e polpa, hamartomas foliculares e defeitos da erupção dentária. A fim de melhor compreender as alterações gengivais associadas às duas síndromes, o objetivo desse estudo foi estabelecer e caracterizar culturas primárias de fibroblastos gengivais de pacientes com RNS e ERS. Foram estabelecidas culturas a partir de tecidos gengivais pela técnica *explant* de pacientes com RNS, ERS e indivíduos não sindrômicos. A atividade metabólica mitocondrial, capacidade de cicatrização e potencial de mineralização foram analisados, respectivamente, por meio dos ensaios de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], cicatrização de ferida e coloração de nódulos de mineralização com vermelho de alizarina. No período de 48 horas, foi observado diferença estatística da atividade metabólica celular entre o controle e o grupo RNS1. Foram observadas diferenças significativas na capacidade de migração entre as

culturas primárias RNS2 e as populações controle. Em relação ao potencial de mineralização os grupos sindrômicos mostraram maior potencial quando comparados com as populações controle. Novos estudos com essas populações que avaliem o tempo de dobramento populacional e a expressão gênica das culturas com maior potencial de mineralização são necessários para uma melhor compreensão desses resultados.

ABSTRACT

MOREIRA, Thais Fernanda. Characterization of primary culture of gingival cells of patients with mutations in *FAM20A* and *FAM20C* genes. 2018. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

A family of kinases called "family with sequence similarity 20" comprises 3 proteins (*FAM20A*, *FAM20B* and *FAM20C*), amongst them *FAM20A* and *FAM20C*, are essential in the control of biomineralization. Recessive mutations in their genes result in syndromes known as Raine's Syndrome (RNS; OMIM # 259775) and Enamel-Renal Syndrome (ERS; MIM # 204690). RNS, is a rare inherited disorder characterized primarily by generalized bone sclerosis, craniofacial anomalies, and ectopic calcifications. Beyond the alterations in bone metabolism, patients who survive infancy exhibit amelogenesis imperfecta, defects in dentin mineralization, gingival fibromatosis, and ectopic gingival calcifications. The ERS, caused by a mutations in the *FAM20A* gene, is characterized by the presence of nephrocalcinosis and pathonogmonic oral manifestations that include hypoplastic amelogenesis imperfecta, gingival fibromatosis, ectopic calcifications in gingiva and dental pulp, follicular hamartomas and defects of the dental eruption. In order to better understand the development of ectopic calcifications in non mineralized connective tissues in both syndromes, gingival primary cell cultures were established using explant technique. Mitochondrial metabolic activity, migration capacity and mineralization potential were performed through the MTT assay ([3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]), wound healing assay and alizarin red staining of mineralization nodules. The results showed a significant difference in cell viability between RNS1 group and control after 48 hours. Significant difference between groups was observed when assessing migration capacity between the control group and RNS2. Regarding the potential of mineralization the cells of syndromic patients showed a higher mineralization potential when compared with controls. Further studies that include population

doubling time and gene expression are necessary for a better understanding of the results.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------|
| Artigo Científico | 18 |
| Folha de Título | 21 |
| Resumo | 22 |
| Abstract | 24 |
| Introdução..... | 26 |
| Materiais e Métodos | 28 |
| Resultados..... | 32 |
| Discussão | 37 |
| Referências | 42 |
| Anexos | 45 |
| Normas da Revista..... | 45 |
| Termo de consentimento livre e esclarecido | 53 |
| Parecer de aprovação do CEP/FM – UnB..... | 55 |

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico: Moreira, Thais Fernanda. Amorim, Bruna. Acevedo, Ana Carolina. Caracterização de cultura primária de células gengivais de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C*. Apresentado sob as normas de publicação da Revista Journal of Dental Research.

FOLHA DE TÍTULO

Caracterização de cultura primária de células gengivais de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C*

Characterization of primary culture of gingival cells of patients with mutations in *FAM20A* and *FAM20C* genes

Thais Fernanda Moreira¹
Ana Carolina Acevedo Poppe²
Bruna de Rabelo Amorim³

¹ Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Professora associada, Laboratório de Histopatologia Bucal, Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da saúde, Universidade de Brasília.

³ Cirurgiã Dentista, Pesquisadora associada Laboratório de Histopatologia Bucal, Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da saúde, Universidade de Brasília.

Correspondência: Prof. Dr. Ana Carolina Acevedo Poppe
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF
E-mail:acevpoppel@gmail.com / Telefone: (61) 31071977

RESUMO

Caracterização de cultura primária de células gengivais de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C*

Resumo

A família de quinases denominada “*family with sequence similarity 20*” compreende 3 proteínas (*FAM20A*, *FAM20B* e *FAM20C*) dentre elas, as *FAM20A* e *FAM20C* que são essenciais no controle da biomineralização. Mutações recessivas em seus respectivos genes resultam nas síndromes conhecidas como Síndrome de Raine (RNS; OMIM #259775) e Síndrome Esmalte-Renal (ERS; OMIM #204690). A RNS, causada por mutações no gene *FAM20C* é uma rara desordem hereditária caracterizada principalmente por esclerose óssea generalizada, anomalias craniofaciais e calcificações ectópicas. Além das alterações no metabolismo ósseo, os pacientes que sobrevivem à infância apresentam amelogênese imperfeita, defeitos na mineralização da dentina, fibromatose gengival e calcificações ectópicas gengivais. A ERS, causada por mutações no gene *FAM20A*, é caracterizada pela presença de nefrocalcinose e manifestações bucais que incluem amelogênese imperfeita hipoplásica, fibromatose gengival, calcificações ectópicas em gengiva e polpa, hamartomas foliculares e defeitos da erupção dentária. A fim de melhor compreender as alterações gengivais associadas às duas síndromes, o objetivo desse estudo foi estabelecer e caracterizar culturas primárias de fibroblastos gengivais de pacientes com RNS e ERS. Foram estabelecidas culturas a partir de tecidos gengivais pela técnica *explant* de pacientes com RNS, ERS e indivíduos não sindrômicos. A atividade metabólica, capacidade de cicatrização e potencial de mineralização foram analisados, respectivamente, por meio dos ensaios de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]), cicatrização de ferida e coloração de nódulos de mineralização com vermelho de alizarina. No período de 48 horas, foi observado diferença estatística da atividade metabólica celular entre o controle e o grupo RNS1. Foram observadas diferenças significativas na capacidade de migração entre as culturas primárias RNS2 e as populações controle. Em relação ao

potencial de mineralização os grupos sindrômicos mostraram maior potencial quando comparados com as populações controle. Novos estudos com essas populações que avaliem o tempo de dobramento populacional e a expressão gênica das culturas com maior potencial de mineralização são necessários para uma melhor compreensão desses resultados.

Palavras-chave

Síndrome de Raine, FAM20C, FAM20A, Síndrome Esmalte-Renal, cultura primária de células, gengiva.

ABSTRACT

Characterization of primary culture of gingival cells of patients with mutations in *FAM20A* and *FAM20C* genes

Abstract

A family of kinases called "family with sequence similarity 20" comprises 3 proteins (*FAM20A*, *FAM20B* and *FAM20C*), amongst them *FAM20A* and *FAM20C*, are essential in the control of biomineralization. Recessive mutations in their genes result in syndromes known as Raine's Syndrome (RNS; OMIM # 259775) and Enamel-Renal Syndrome (ERS; MIM # 204690). RNS, is a rare inherited disorder characterized primarily by generalized bone sclerosis, craniofacial anomalies, and ectopic calcifications. Beyond the alterations in bone metabolism, patients who survive infancy exhibit amelogenesis imperfecta, defects in dentin mineralization, gingival fibromatosis, and ectopic gingival calcifications. The ERS, caused by a mutations in the *FAM20A* gene, is characterized by the presence of nephrocalcinosis and pathognomonic oral manifestations that include hypoplastic amelogenesis imperfecta, gingival fibromatosis, ectopic calcifications in gingiva and dental pulp, follicular hamartomas and defects of the dental eruption. In order to better understand the development of ectopic calcifications in non mineralized connective tissues in both syndromes, gingival primary cell cultures were established using explant technique. Mitochondrial metabolic activity, migration capacity and mineralization potential were performed through the MTT assay ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), wound healing assay and alizarin red staining of mineralization nodules. The results showed a significant difference in cell viability between RNS1 group and control after 48 hours. Significant difference between groups was observed when assessing migration capacity between the control group and RNS2. Regarding the potential of mineralization the cells of syndromic patients showed a higher mineralization potential when compared with controls. Further studies that include population doubling time and gene expression are necessary for a better understanding of the results.

Keywords

Raine Syndrome, FAM20A, FAM20C, Enamel Renal Syndrome, primary culture, gingiva

INTRODUÇÃO

A família de quinases denominada “*family with sequence similarity 20*” compreende 3 proteínas (FAM20A, FAM20B e FAM20C) envolvidas nas vias de secreção e localizadas no lúmen do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e matriz extracelular. Devido a sua função de fosforilação de resíduos de Ser, Thr ou Tyr são também denominadas “*secretory pathway kinases*” [1,2]. Dentre elas, destacamos a FAM20A e FAM20C as quais fosforilam proteínas e proteoglicanos essenciais para a regulação dos processos de biomineralização [3].

A caseína quinase FAM20C possui mais de 100 substratos, com função ampla nos processos de biomineralização, metabolismo de fosfato, adesão celular e função cardíaca [4, 5 e 6], dentre estes destacamos as proteínas SIBLINGS (“*small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*”) e o hormônio FGF23 (fator de crescimento fibroblástico 23). A função deficiente da FAM20C em decorrência de mutações ocasiona uma displasia esquelética recessiva conhecida como Síndrome de Raine (RNS; OMIM #259775) cuja prevalência estimada é de $<1/1.000.000$ [7]. A RNS tem sido definida como uma doença rara caracterizada por uma esclerose óssea generalizada, face característica, calcificações em tecidos conjuntivos, no cérebro e nos rins e letalidade neonatal principalmente por falência respiratória [7]. Atualmente, com o aumento dos números de casos de RNS não letal o fenótipo da doença tem se tornado variável, geralmente com presença de raquitismo hipofosfatêmico associado. Esses achados clínicos também têm sido relatados em modelos animais. Diversos autores demonstraram que a inativação do gene *fam20c* em camundongos resulta em alterações ósseas e dentárias semelhantes a RNS. Além disso, observaram que o raquitismo hipofosfatêmico decorre de alterações na modulação do FGF23 causando hipofosfatemia decorrente de hiperfosfatúria [2, 8, 9]. No que diz respeito às manifestações orodentais dos pacientes RNS, foram observados amelogênese imperfeita hipoplásica, micrognatia, formação radicular incompleta, câmaras pulpares aumentadas, nódulos pulpares, hiperplasia gengival e calcificações ectópicas nos tecidos gengivais, abscessos periapicais recorrentes nas dentições decídua e permanente[14].

Mutações recessivas da pseudoquinase *FAM20A* estão associadas a Síndrome Esmalte-Renal (ERS; MIM#204690). Inicialmente duas síndromes com fenótipos diferentes foram relatadas separadamente, amelogênese Imperfeita e nefrocalcinose e Amelogênese Imperfeita (MIM#204690) e fibromatose gengival (AIFGS, OMIM #614253). Após a identificação de mutações no gene *FAM20A* em ambas confirmou-se que as duas condições são expressividade variável de uma única doença, ERS [10]. Pacientes ERS manifestam calcificações ectópicas arteriais e renais. O fenótipo orodental consiste em amelogênese imperfeita hipoplásica que afeta a dentição decídua e permanente, atraso na erupção dentária, calcificações pulpares, hamartomas foliculares e fibromatose gengival [11].

Pacientes com mutações recessivas nos genes *FAM20A* e *FAM20C* apresentam mineralizações ectópicas em tecidos moles provavelmente devido à desregulação que ocorre entre inibidores e ativadores dos processos de biomineralização. A mineralização ectópica é um processo de deposição de complexos de cálcio e fosfato na matriz extracelular em tecidos não mineralizados. Apesar de ser considerada fisiológica durante o envelhecimento, defeitos em quinases que regulam níveis de cálcio e fosfato poderiam resultar nessas alterações. Nos indivíduos ERS podemos observar calcificações no endotélio, nos rins, tecido pulpar e gengiva. Enquanto que nos indivíduos RNS as mineralizações foram observadas no cérebro, tecidos pulpares, rins, tecidos gengivais [7, 10].

Desde 2003, 5 famílias que receberam diagnóstico molecular de mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C* são acompanhadas na clínica de Anomalias Dentárias na Unidade de Saúde Bucal do Hospital Universitário de Brasília. Com o intuito de melhor compreender o papel das *FAM 20A/C* na patogênese das calcificações gengivais ectópicas observadas nesses pacientes o objetivo de nosso estudo foi caracterizar culturas primárias de células gengivais de pacientes ERS e RNS e comparar a morfologia, atividade metabólica, capacidade de migração e potencial osteogênico com culturas de pacientes saudáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, parecer número 967.387 no ano de 2015.

Cultura de células

Para obtenção das culturas primárias, fibroblastos derivados de tecido gengival foram obtidos através de cirurgias realizadas com finalidade terapêutica e foram cedidos pelos pacientes ou pelos responsáveis, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a remoção, os tecidos foram transferidos para tubos contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (*Gibco®*, *Invitrogen*) gelado, com 20% de soro fetal bovino (SFB) (*Invitrogen*), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1% de anfotericina B (*Gibco®*). A obtenção das culturas primárias das células foi realizada por meio da técnica de explante que consiste na fragmentação dos tecidos coletados [18]. As culturas foram mantidas em incubadora em condições ótimas para crescimento (37°C, 5% de CO₂, umidificada), sendo o meio de cultura trocado a cada três dias.

Foram coletados tecidos gengivais de diferentes indivíduos e foram estabelecidas oito populações diferentes de culturas primárias (2 de pacientes RNS, 1 de pacientes ERS e 5 de indivíduos controle com a mesma faixa etária e sem complicações sistêmicas).

Ensaio de atividade metabólica celular

A avaliação da atividade metabólica celular foi feita através de um ensaio colorimétrico que utiliza o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) um sal amarelado, que quando é reduzido em função da atividade celular

mitocondrial forma cristais de formazan, os quais apresentam cor azul a púrpura. [19]. Nesse ensaio, as células foram distribuídas em 2 placas de 96 poços, referentes aos períodos de 24 horas e 48 horas após o plaqueamento, na densidade de 5000 células por poço. Cada linhagem foi plaqueada em doze poços, e cada poço continha 100 uL de meio DMEM completo. A solução de MTT (*Sigma-Aldrich*) foi preparada a 5mg/mL, sendo diluída em PBS. Após os períodos pré-determinados, adicionou-se a solução de MTT às células (10uL para 100 µL de meio). As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas durante 4 horas na temperatura de 37 °C e 5% de CO². Em seguida, o conteúdo dos poços foi aspirado e adicionou-se 100 µL de Isopropanol acidificado para solubilizar os cristais de formazan, os quais refletem o estado funcional da cadeia respiratória por meio da coloração azulada. As placas foram suavemente agitadas em vórtex, em velocidade mínima, por 10 minutos, até a dissolução dos cristais. Por fim, a absorbância foi aferida em uma leitora de microplaca no comprimento de onda de 570 nm (Thermo Plate TP reader). A partir dos dados obtidos, foi construída um gráfico (absorbância x tempo) para comparar a atividade metabólica dos grupos de células de pacientes síndrômicos e dos grupos controle. Para análise estatística deste experimento, foi utilizado o teste one way ANOVA não paramétrico (Teste de *Kruskal Wallis*) seguido de comparação múltipla de *Dunns* através do programa GraphPad 5.0 para o sistema operacional *Windows*, adotando $p < 0,05$ para a comparação entre os grupos síndrômicos relacionados ao controle. Também foi feita uma análise para mensurar se houve diferença entre cada grupo com relação aos dois períodos, para tal foi utilizado do teste de *Mann-Whitney* adotando $p < 0,05$.

Ensaio de cicatrização de ferida

O ensaio de cicatrização foi realizado para analisar a capacidade de migração celular [12]. Para tal, placas para cultura

de células de 6 poços (*kasvi*) foram previamente tratadas com solução de fibronectina (*Sigma-Aldrich*) (10µg/mL, diluída em PBS, p/v; 2mL/poco) e incubadas a 4°C, durante a noite. A solução de fibronectina foi removida e as placas foram mantidas em fluxo laminar para secagem. As placas ficaram armazenadas na temperatura de 4°C até seu uso. Após o preparo das placas, as células foram distribuídas na densidade de 500.000 células por poço; cada linhagem foi plaqueada em três poços. Após 48 horas, foi feito um risco em linha reta na monocamada confluyente de células, com uma ponteira plástica de pipeta de 200 µL, lavagem com PBS e adição de meio DMEM completo. Foi feito acompanhamento e registro fotográfico de cada um dos poços, imediatamente após a realização da ferida (0h) e em tempos subsequentes de 12 e 24 horas, utilizando microscópio ótico de luz invertida (*Zeiss Primo Vert*), equipado com câmera digital (*Zeiss ERC 5s*) em objetiva de 10x. As imagens foram obtidas pelo *software ZEN Blue Edition (Zeiss)*. A capacidade de migração celular foi expressa pela média das distâncias de três pontos estabelecidos em cada fotografia para cada intervalo. Para isso, os pontos da ferida foram delimitados utilizando-se ferramenta do *software ZEN Blue Edition, (Zeiss)* o qual calculava as distâncias entre as bordas. Para cada microfotografia, calculou-se a média das distâncias fornecidas pelos pontos e dessa forma foi calculada a porcentagem de migração para cada grupo. A taxa de migração celular foi estimada considerando-se a porcentagem de fechamento da ferida em cada período de tempo, em relação às distâncias iniciais (0h). Para análise estatística deste experimento, cada poço foi considerado um experimento independente e foi utilizado o teste one way ANOVA não paramétrico (Teste de *Kruskal-Wallis*) seguido de comparação múltipla de *Dunns* através do programa GraphPad 5.0 para o sistema operacional *Windows*, adotando $p < 0,05$.

Ensaio de mineralização

O vermelho de alizarina S é um método colorimétrico para avaliação de depósitos minerais em cultura de células, uma vez que ele se liga aos cátions de cálcio por quelação, formando um complexo visível através da sua coloração avermelhada [12,13].

A capacidade de mineralização foi avaliada por ensaios de coloração de nódulos de mineralização com vermelho de alizarina S [13]. Para a realização do experimento, os fibroblastos gengivais foram plaqueados na concentração de 100.000 células/poço em uma placa para cultura de células de 6 poços, formando 2 grupos cada um com três poços. O primeiro grupo com meio indutor de mineralização, composto por *Alpha modification of Eagle's medium* (α -MEM; *Invitrogen*) suplementado com 10% de SFB, 100 μ g/mL de ácido ascórbico (AA), 10mM de β -glicerofosfato (BGP) e 10nM de dexametasona. E no segundo, avaliado como controle, foi utilizado o meio DMEM 10% SFB. Ambos os meios utilizados foram trocados a cada 3 dias. Após o 21º dia de tratamento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com vermelho de Alizarina S (2g em 100mL de água destilada) em pH de 4,2 (*Sigma-Aldrich*) e cuidadosamente lavadas.

RESULTADOS

Aspectos morfológicos

Por meio de acompanhamento com microscópio de luz invertida é possível visualizar que as células apresentaram um fenótipo alongado ou estrelado e longos prolongamentos citoplasmáticos, sem alterações relevantes entre os grupos no que diz respeito as características típicas de fibroblastos em culturas *in vitro*, mas as células RNS1 aparentemente são mais volumosas que as células referentes aos outros grupos. (Figura 1)

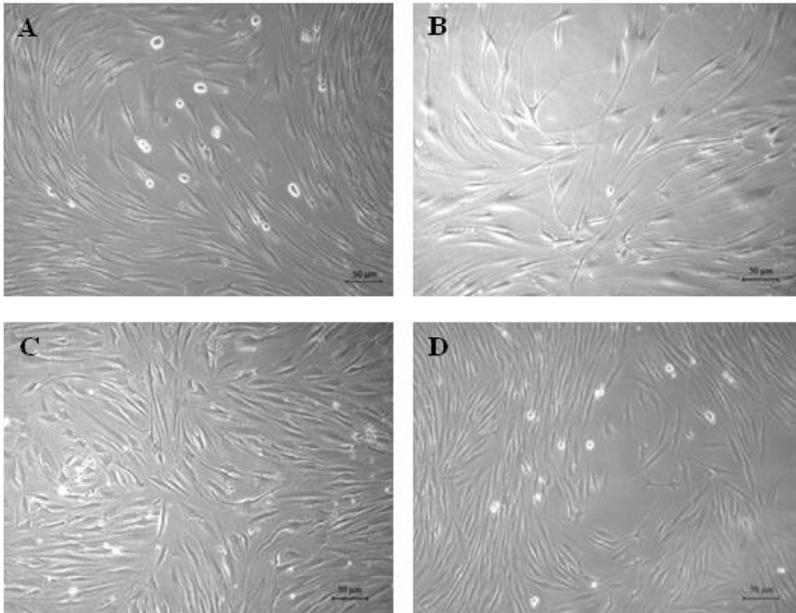


Figura 1. Morfologia Celular. Fotomicrografia de culturas primárias de fibroblastos gengivais. Nota-se a morfologia celular alongada sugerindo fibroblastos. A=controle, B= paciente 1 Síndrome de Raine, C= paciente 2 Síndrome de Raine, D= paciente Síndrome esmalte renal.

Atividade metabólica das células RNS diminuiu em 48 horas

Com a finalidade de avaliar a atividade metabólica foi realizado o ensaio MTT. Foram avaliados um grupo de células ERS e o grupo RNS 1, a população celular do paciente síndrômico, que possui o fenótipo mais grave de síndrome de Raine. Este ensaio foi feito e analisado em dois períodos – 24 e 48 horas – após o plaqueamento. Todos os grupos tiveram uma taxa de metabolismo celular significativamente diferente entre os períodos de 24 horas e de 48 horas quando comparados entre si. Sendo que o grupo ERS teve um comportamento mais semelhante ao do grupo controle, não havendo diferença estatística em nenhum dos períodos quando comparado ao controle. Já o grupo RNS1, não teve diferença estatística significativa no período de 24 horas, mas após 48 houve uma redução significativa quando comparada com o grupo controle. (Figura 2.)

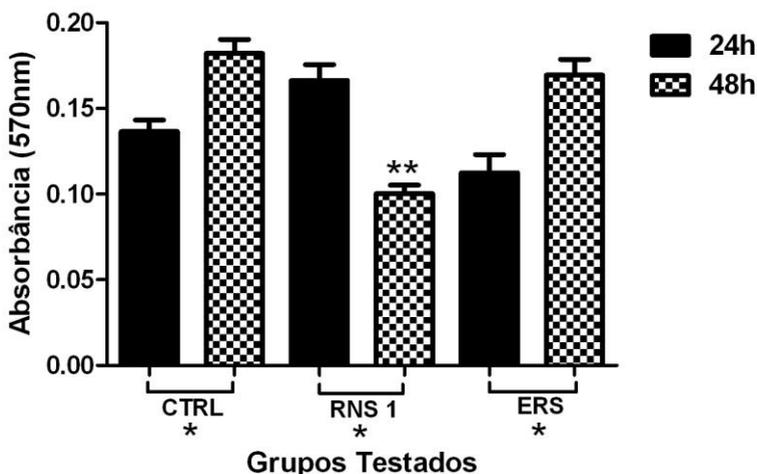


Figura 2. Avaliação da atividade metabólica celular dos grupos síndrômicos. No período de 48 horas, houve diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo RNS1. Análise de variância não paramétrica (ANOVA), seguida de comparação múltipla de *Dunns*. (* $p < 0,05$).

Potencial de migração celular tende a diminuir nos grupos síndrômicos após 24 horas

A fim de avaliar o potencial de migração das diferentes populações celulares foi realizado o ensaio de cicatrização de ferida. O ensaio de cicatrização sugeriu que em ambos os períodos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as populações RNS1 e ERS quando comparadas ao controle. No período de 24 horas houve diferença estatística entre o paciente RNS2 e o grupo controle, no qual o grupo sindrômico apresentou uma taxa de migração menor que a do grupo controle. (Figuras 3 e 4)

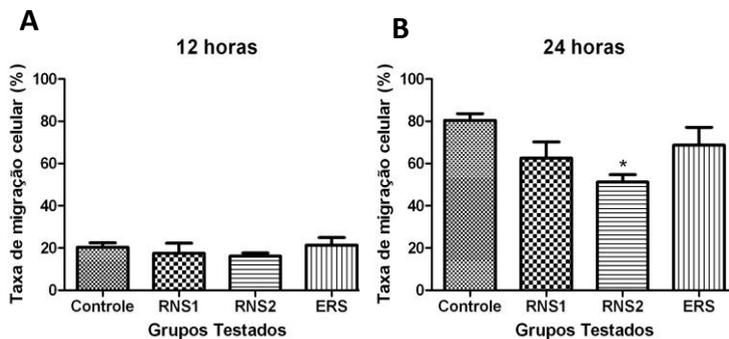


Figura 3. Avaliação do potencial de migração dos grupos sindrômicos nos períodos de 12 (gráfico A) e 24 (gráfico B) horas. Não houve diferença estatística entre os grupos RNS1 e ERS quando comparadas com o controle. O paciente RNS2 teve uma taxa de migração significativamente menor que a do controle. Teste one way ANOVA não paramétrico seguido de comparação múltipla de Dunns. ($p < 0,05$)

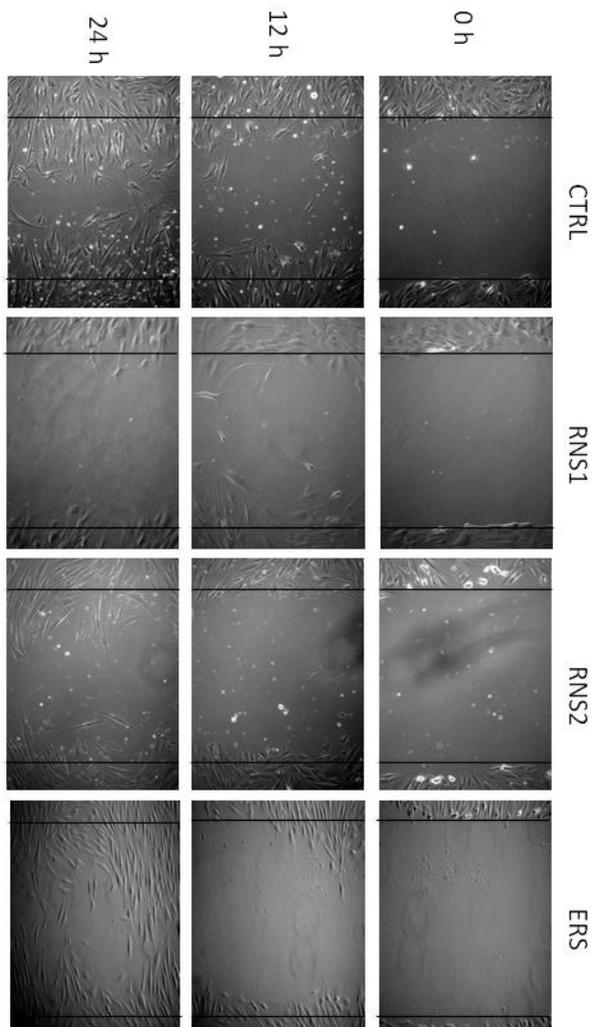


Figura 4. Avaliação da migração celular do Ensaio de Cicatrização de Ferida. Períodos de 0 hora, 12 horas e 24 horas. Microscopia de luz invertida. CTRL= Paciente controle RNS1= Paciente 1 Síndrome de Raine RNS2= Paciente 2 Síndrome de Raine ERS= Paciente Síndrome Esmalte-Renal

Potencial osteogênico das células sindrômicas

Foi observado que os grupos sindrômicos apresentaram capacidade de mineralização em meio indutor (α -MEM + BGP + AA+ dexametasona) após 21 dias. Foram observadas diferenças de coloração entre os grupos avaliados, sendo que as populações RNS 1 e ERS apresentaram uma maior intensidade na coloração, sugerindo uma maior capacidade de mineralização que o grupo RNS 2 e os controles. A população controle apresentou uma coloração menos intensa que os grupos de pacientes sindrômicos, em todos os grupos era possível observar deposição de nódulos de mineralização entre uma e duas semanas de tratamento visíveis no microscópio de luz invertida. Por meio da coloração com alizarina foi possível confirmar após 21 dias, a presença de nódulos minerais distribuídos por toda a extensão dos poços. Apesar de não ter sido adotado um método de quantificação da coloração, é perceptível a diferença entre as respostas de indução a mineralização entre os grupos em decorrência da intensidade com que os grupos supracitados estão corados em relação ao grupo controle.(Figura 5).

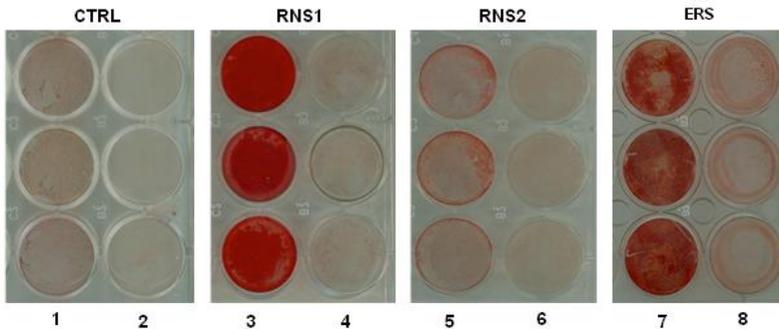


Figura 5. Avaliação do potencial de mineralização do ensaio de mineralização de fibroblastos gengivais corados com vermelho de alizarina após 21 dias de indução. A= Paciente controle B= Paciente 1 Síndrome de Raine C= Paciente 2 Síndrome de Raine D= Paciente Síndrome Esmalte-Renal. A

fileiras 1, 3, 5 e 7 receberam meio indutor. As fileiras 2, 4, 6 e 8 receberam meio controle (α MEM+BGP+AA+dexametasona).

DISCUSSÃO

Neste estudo teve-se como propósito estabelecer e caracterizar culturas primárias de células gengivais de pacientes com RNS e ERS em comparação a um grupo controle para avaliação de morfologia, atividade metabólica, potencial de migração e mineralização celular.

A síndrome de Raine se caracteriza pela presença de manifestações sistêmicas e bucais devido a uma desregulação da biomineralização causada por mutações recessivas do gene *FAM20C*. Dentre as manifestações bucais, destacamos a presença de calcificações ectópicas na gengiva. Estudos em modelos animais *knockout* têm avaliado as alterações no esmalte e no osso [8], porém calcificações em tecidos não mineralizados tem sido observadas nos pacientes com variantes não letais da RNS, de forma que essa síndrome é, também, uma síndrome de calcificações ectópicas dos tecidos não mineralizados. Até o presente as calcificações ectópicas na gengiva não haviam sido estudadas.[20]

Análises por fosfoproteomas secretados sugerem que a *FAM20C* talvez não esteja restrita na fosforilação de proteínas que envolvem cálcio-ligantes, porque mais de dois terços das fosfoproteínas do soro humano, do plasma e do fluido cérebro-espinhal contêm fosfato sem o motivo S-x-E/ps. De modo que nos relatos dos pacientes que sobreviveram até então a adolescência são descritas calcificações cerebrais e renais [7]. Esses dados bem como o fato de que a *FAM20C* é encontrada em organismos que não tem tecidos mineralizados, sugerem que a *FAM20C* tenha uma função biológica que vai além da biomineralização [2]. Mais de 100 proteínas são substratos da *FAM20C*, e estes atual em processos biológicos como biomineralização, metabolismo de fosfato, adesão e migração celular e função cardíaca [4, 5, 6, 20].

A FAM20A atualmente é considerada uma pseudoquinase em relação dimérica com a FAM20C, pois não possui um sítio catalítico para sua atividade [3, 15]. Mutações no *FAM20A* levam a alterações do desenvolvimento dentário e nefrocalcinose, uma calcificação ectópica do parênquima [16, 17]. Em relação aos fenótipos das duas síndromes em ambas os pacientes apresentam calcificações renais, porém em menor grau nos pacientes FAM20C [14, 10]. Além disso, são observadas em ambas as síndromes amelogenese imperfeita (AI) do tipo hipoplásica, fibromatose gengival e calcificações ectópicas. Mas ao contrário da RNS, a dentina é normal, com túbulos dentinários bem formados [8]. Além disso, na ERS há calcificações pulpares o que sugere que a função das proteínas é variável de acordo com o tecido.

A escolha do modelo de estudo foi com o intuito de melhor compreender as alterações gengivais observadas na duas síndromes. Desde 2003, são acompanhadas 5 famílias na clínica de Atendimento a Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias da Divisão de Odontologia do HUB, as quais foram previamente descritas por Acevedo *et al* 2015, de Paula, 1995, *Jaureguiberry G et al* 2013 [11,14, 21]. Devido a indicações terapêuticas em decorrência do grau de hiperplasia gengival, foram doados fragmentos de gengiva após cirurgias de exodontias e gengivectomia e estabelecidas culturas primárias. A gengiva é um tecido facilmente obtido a partir extração de dentes com indicação terapêutica e os protocolos de obtenção de fibroblastos são amplamente validados na literatura [18]. As células gengivais podem ser isoladas empregando-se métodos diversos, contudo o método escolhido para isolamento das células em questão foi o do explante, devido a simplicidade e conveniência, bons resultados reportados na literatura e menor custo e consumo de tempo na etapa da execução [18]. Não obstante, também existem desvantagens quanto ao método

como o maior tempo necessário ao início do crescimento e confluência das células. Ao estabelecer as culturas primárias fazendo uso do explante, foram necessários em média quatro semanas para estabelecer estoques iniciais na segunda passagem de cada cultura, e cada tecido foi cultivado em média 2 vezes, até que a migração de células se mostrasse estorvada.

O ensaio de MTT foi realizado para avaliar a atividade metabólica celular nas populações sindrômicas e devido a dificuldades técnicas somente um grupo sindrômico RNS 1 foi avaliado. Essa análise é realizada por meio do teste de avaliação da atividade mitocondrial que se baseia na habilidade que as células metabolicamente ativas têm de incorporar o MTT e reduzi-lo a cristais de formazan, os quais apresentam cor azul a púrpura. De modo que a quantidade de formazan produzida, aferida por espectrometria, é diretamente proporcional a quantidade de células metabolicamente ativas [19]. Este ensaio foi analisado em dois tempos 24 e 48 horas após o plaqueamento. O grupo RNS1 apresentou uma taxa de diminuição significativa da atividade metabólica celular após 48 horas de plaqueamento. Com relação ao grupo ERS, apesar de no primeiro período de avaliação ele ter mostrado uma taxa de multiplicação menor quando comparada ao grupo controle e no período de 48 horas houve um acréscimo dessa taxa, não houve diferença entre eles. Apesar do fato das proteínas FAM20 participarem na regulação de processos celulares essenciais por meio da fosforilação de proteínas secretadas ambos os grupos sindrômicos possuem capacidade de atividade metabólica *in vitro* e mostram tendências distintas em diferentes tempos de plaqueamento. De tal modo, considerando que as células RNS1 da presente pesquisa apresentaram atividade metabólica mais lenta, estudos posteriores como o de dobramento populacional é recomendado para confirmar tais achados.

O ensaio de cicatrização de ferida avalia a migração celular [12] e utiliza-se da criação de uma ferida artificial na

camada monocelular confluyente; as células da borda tendem a migrar em direção a essa abertura para estabelecer o contato entre as bordas novamente, de forma que a lesão produzida *in vitro* cicatrize. Em 2015, Tagliabracci publicou um estudo que mostrou que a FAM20C apresentava uma especificidade de substrato mais ampla do que a previamente apreciada. Sugerindo que a quinase FAM20C desempenha papéis que vão além da biomineralização, incluindo homeostase lipídica, cicatrização de feridas, migração e adesão celular. Neste mesmo estudo, ele mostrou que a depleção de FAM20C em células de câncer de mama tem um efeito dramático na adesão, migração e invasão celular. Em 2018, *Chao Liu et al*, em um estudo com células dentárias mesenquimais e imortalizadas de camundongos mostrou que a linhagem celular *fam20c* nocaute teve um declínio na taxa de fechamento de ferida artificial comparada ao grupo controle no período de 24 horas [22]. Os dados obtidos com as culturas dos pacientes RNS1 e RNS2 visualmente sugeriram um atraso no fechamento da ferida, mas houve diferença estatística somente no grupo representado pelo paciente RNS2. Tal paciente possui a mutação em um sítio *splicing* do gene *FAM20C* e possui o fenótipo atenuado da síndrome, o que sugere que sua mutação pode gerar maior impacto na capacidade de migração celular, porém mais estudos devem ser realizados para comprovar tal afirmação. Com relação a ERS, ainda não foram realizados estudos que avaliassem tais características em tecidos gengivais de pacientes com mutações no gene *FAM20A*, sendo tais resultados inéditos.

Considerando que na RNS e a ERS são observadas calcificações gengivais, foi realizado ensaio de indução de mineralização no qual é avaliada a presença de nucleação pelo método colorimétrico com vermelho de alizarina S. Esse método é amplamente usado na literatura [13]. A comparação das diferentes populações de células controle e sindrômicos com e sem meio indutor sugerem que as culturas referentes aos

pacientes sindrômicos têm um potencial de mineralização aumentado. Apesar de todas as linhagens celulares apresentaram capacidade mineralizante, as colorações sugerem que a deposição de nódulos de mineralização nas células RNS 1 foi maior em comparação as outras populações, tanto controle quanto ERS. Considerando que as mutações dos pacientes RNS são diferentes, o RNS1 (c.1487C > T; p.P496L) que apresenta um quadro mais grave da doença tem uma mutação *missense* no sítio catalítico que ocasionou a substituição de uma prolina por uma leucina, enquanto que no paciente RNS2 (c.784 + 5 g > c) a mutação ocorreu no sítio de *splicing* e o fenótipo é mais atenuado, mutações descritas por Acevedo *et al* em 2015 [14]. Atualmente, esses resultados são inéditos e não existem outros estudos que permitam comparar nossos achados. As observações comparativas foram visuais e a quantificação colorimétrica por meio de análise espectrofotométrica seria mais precisa e confirmaria os resultados.

Em conclusão, os resultados obtidos a partir do presente sugeriram alterações na atividade metabólica, na capacidade de mineralização e na capacidade de migração das culturas de pacientes RNS em relação aos grupos estudados. Porém, esses resultados deverão ser confirmados com ensaios adicionais que avaliem o tempo de dobra populacional e de expressão gênica para uma melhor compreensão desses resultados.

REFERÊNCIAS

- 1) Tagliabracci, V. S., Pinna, L. A. & Dixon, J. E. Secreted protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 38, 121–130 (2013).
- 2) Sreelatha, A., Kinch, L. N. & Tagliabracci, V. S. The secretory pathway kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 1687–1693 (2015).
- 3) Cui, J. et al. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *eLife* 4, e06120 (2015).
- 4) Tagliabracci, V. S. et al. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science* 336, 1150–1153 (2012).
- 5) Ishikawa, H. O., Xu, A., Ogura, E., Manning, G. & Irvine, K. D. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates biomineralization proteins. *PLoS ONE* 7, e42988 (2012).
- 6) Pollak, A. J. et al. Phosphorylation of serine96 of histidine-rich calcium-binding protein by the Fam20C kinase functions to prevent cardiac arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 9098–9103 (2017).
- 7) Faundes V, Castillo-Taucher S, Gonzalez-Hormazabal P, Chandler K, Crosby A, Chioza B. Raine syndrome: An overview. *Eur J Med Genet.* 2014;57:536–42.
- 8) Vogel, P. et al. Amelogenesis imperfecta and other biomineralization defects in Fam20a and Fam20c null mice. *Vet. Pathol.* 49, 998–1017 (2012).
- 9) Rafaelsen SH, Raeder H, Fagerheim AK, Knappskog P, Carpenter TO, Johansson S, Bjerknes R. 2013. Exome sequencing reveals FAM20c mutations associated with fibroblast growth factor 23-related hypophosphatemia, dental anomalies, and ectopic calcification. *Journal of Bone and Mineral Research* 28:1378–1385. doi: 10.1002/jbmr.1850.
- 10) de la Dure-Molla et al. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2014, 9:84 <http://www.ocrd.com/content/9/1/84>
- 11) L.M.Paula et al. Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous Family. *Archives of Oral Biology.* Volume 50, Issue 2, February 2005, Pages 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.11.023>

- 12) Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*.2007;2(2):329-33.
- 13) Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis and rheumatism*.1983;26(2):191-200.
- 14) Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, de Lima CL, Castro LC, Yamaguti PM, et al. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC medical genetics*. 2015;16:8.
- 15) Cui, J. et al. Structure of Fam20A reveals a pseudokinase featuring a unique disulfide pattern and inverted ATP-binding. *eLife* 6, e23990 (2017)
- 16) O'Sullivan, J. et al. Whole-exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 616–620 (2011)
- 17) Wang, S. K. et al. FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome(ERS). *PLoS Genet.* 9, e1003302 (2013)
- 18) Priya N, Sarcar S, Majumdar AS, SundarRaj S. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2014;8(9):706-16.
- 19) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- 20) Tagliabracci VS, Wiley SE, Guo X, Kinch LN, Durrant E, Wen J, et al. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell*.2015;161(7):1619-32.
- 21) Jaureguiberry G et al. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. *Nephron Physiol*. 2012;122(1-2):1-6. doi: 10.1159/000349989. Epub 2013 Feb 23.

22) Chao Liu et al. Abrogation of Fam20c altered cell behaviors and BMP signaling of immortalized dental mesenchymal cells. *Experimental Cell Research* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.004>

ANEXO I**NORMAS DA REVISTA**

The Journal of Dental Research (JDR) adheres to the CSE (8th Edition) editorial style. All submitted manuscripts should be formatted in this style. The Journal of Dental Research (JDR) is a peer-reviewed scientific journal dedicated to the dissemination of new knowledge and information on all science relevant to dentistry and to the oral cavity and associated structures in health and disease. The Journal of Dental Research's primary readership consists of oral, dental and craniofacial researchers, clinical scientists, hardtissue scientists, dentists, dental educators, and oral and dental policy-makers. The Journal is published monthly, allowing for frequent dissemination of its leading content. The Journal of Dental Research also offers OnlineFirst, by which forthcoming articles are published online before they are scheduled to appear in print. Authors of all types of articles should be aware of the following guidelines when submitting to JDR.

ONLINE SUBMISSION

Submissions to the Journal of Dental Research are only accepted for consideration via the SAGETrack online manuscript submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jdr>. Authors who do not have an active account within the system are required to create a new account by clicking, "Create Account," on the log-in page. The system will prompt the authors through a step by step process to create their account. Once created authors can submit their manuscripts by entering their "Author Center" and clicking the button by "Click Here to Submit a New Manuscript." If any difficulty is encountered at anytime during the account creation or submission process, authors are encouraged to contact the Journal of Dental Research at jdr@iadr.org.

MANUSCRIPT REQUIREMENTS BY TYPE .

The Journal of Dental Research accepts the following types of manuscripts for consideration:

Original Research Reports: These manuscripts are based on clinical, biological, and biomaterials and bioengineering subject matter. Manuscripts submitted as research reports have a limit of 3,200 words (including introduction, materials, methods results, discussion and; excluding abstracts, acknowledgments, figure legends and references); a total of 5 figures or tables; 40 references; and must contain a 300 word abstract.

Letters to the Editor*: Letters must include evidence to support a position about the scientific or editorial content of the JDR. Manuscripts submitted as a letter to editor have a limit of 250 words. No figures or tables are permitted. Letters on published articles must be submitted within 3 months of the article's print publication date.

Guest Editorials*: A clear and substantiated position on issues of interest to the readership community can be considered for this manuscript type. Guest Editorials are limited to 1,000 words. No figures or tables are permitted.

Discovery!: Essays that explore seminal events and creative advances in the development of dental research are considered for the "Discovery!" section of the journal. Manuscripts submitted for "Discovery!" have a limit of 2,500 words and a total of 2 figures or tables. Manuscripts are to be submitted by invitation only.

Critical Reviews in Oral Biology & Medicine: These manuscripts should summarize information that is well known and emphasize recent developments over the last three years with a prominent focus on critical issues and concepts that add a sense of excitement to the topic being discussed. Manuscripts are to be submitted by invitation only. Authors interested in submitting to this section must contact the Editor of Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, Dr. Dana Graves, at dgraves@iadr.org for submission approval and instructions. Manuscripts submitted as Critical Reviews have a limit of 4,000 words; a total of 6 figures or tables; 60 references; and must contain a 300 word abstract.

Additional Instructions for Critical Reviews:

-It is important to include several illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score.

-Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. NOTE: authors will need to obtain permission to reproduce a previously published figure or table.

-Due to the broad readership, abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field. Keep abbreviation use to a minimum.

-The cover page, abstract, text, summary, figure legends, and tables should be combined into a single Word document. Figures should be submitted as a separate document.

-To view examples of recent Critical Reviews in the Journal, please click the following links:
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/86/9/800> or
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/85/7/584>

*Brief responses to Letters to the Editor or Guest Editorials will be solicited for concurrent publication.

Clinical Reviews (formerly Concise Reviews): These manuscripts are generally systematic reviews of topics of high clinical relevance to oral, dental and craniofacial research. Meta-analyses should be considered only when sufficient numbers of studies are available. Manuscripts that include investigations of limited study quality of understudied areas are typically not acceptable as topics for a clinical review. Although some systematic reviews may be well done, those that receive highest scientific priority will only be considered given the very limited space allowed for these reviews in the journal. Manuscripts submitted as Clinical Reviews have a strict limit of 4,000 words (including introduction, materials, methods results, discussion and; excluding abstracts , acknowledgments, figure legends and references); a total of 6 figures or tables; up to a maximum of 60 references; and must contain a 300 word abstract. Manuscripts above the 4,000 word/6 figure or table limit may use supplemental appendices for other supporting information that would be available online only.

Additional Instructions for Clinical Reviews:

-It is important to include illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score.

-Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. NOTE: authors will need to

obtain permission to reproduce a previously published figure or table.

-Due to the broad readership, abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field. Keep abbreviation use to a minimum.

-The cover page, abstract, text, summary, figure legends, and table(s) should be combined into a single Word document. Figures should be submitted as a separate document.

-To view examples of recent Clinical Reviews in the Journal, please click the following links:
<http://jdr.sagepub.com/content/90/3/304.full.pdf+html> or
<http://jdr.sagepub.com/content/90/5/573.full.pdf+html>

All submissions must include a title page and be accompanied by a cover letter and list of suggested reviewers. Cover letters should certify the research is original, not under publication consideration elsewhere, and free of conflict of interest. Title pages should include: abstract word count, total word count (Abstract to Acknowledgments), total number of tables/figures, number of references, and a minimum of 6 keywords. Keywords cannot be words that have been included in the manuscript title. Key words should be selected from Medical Subject Headings (MeSH) to be used for indexing of articles. See: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> for information on the selection of key words.

Please submit the names and email addresses of four preferred reviewers when prompted by the SAGETrack system. Preferred reviewers cannot be colleagues at the contributors' institution or present or former collaborators.

TITLES

Titles can consist of a maximum of 75 characters (including spaces). Titles do not normally include numbers, acronyms, abbreviations or punctuation. The title should include sufficient detail for indexing purposes but be general enough for readers outside the field to appreciate what the paper is about.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are required to report all sources of support for their project or study, including but not limited to: grant funds, commercial sources, funds from a contributors' institution. Do not refer to a study being "partially funded by the cited sources." Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed. Authors are required to specify during the submission

process if their paper received funding from NIH, NIDCR, or any other NIH Institute or Center and provide the grant number. To comply with the NIH Public Access Mandate, for qualifying NIH-funded papers, the Journal of Dental Research will deposit the final, copyedited paper to PubMed Central on behalf of the authors.

Any perceived or actual conflicts of interest need to be identified in the acknowledgments section. The JDR abides by the International Committee of Medical Journal Editors guidelines for the Ethical Considerations in the Conduct and Report of Research (<http://www.icmje.org>). Authors are requested to include this information in the acknowledgments section and the corresponding author must confirm that all co-authors have reported any potential conflicts.

FIGURE AND TABLE REQUIREMENTS

These guidelines are intended to aid authors in providing figures that will reproduce well in both print and online media. Submitting digital image files that conform to these guidelines will prevent delays in the review and publication processes, and maximize the published quality of your figures. Figure Types JDR figures can fall into one of three categories: Continuous-tone images, Line-art images, and Combination images. Each image type has specific requirements in terms of the resolution needed for publication and the file types best suited for the figure. See the following panels for examples and requirements. Continuous-tone Image Minimum resolution: 300dpi. Preferred File Formats: TIFF, Bitmap. Line-art Image Minimum resolution: 800dpi. Preferred File Formats: EPS, PowerPoint, Illustrator. Combination Image Minimum resolution: 800dpi. Preferred File Formats: PDF, EPS, PowerPoint, Illustrator, InDesign.

Resolution

In order for a figure to be used in publication, its Digital Image File must have the required resolution when it is created. The resolution cannot be raised after the original image is made. Attempting to do so (for example, with Adobe Photoshop's® "Image Size" command) results in the addition of artificial pixels that distort the image and lower its sharpness. The figures on the right show an example of this reduced sharpness. Line-art supplied at high resolution (1000dpi). Using "Image Size" to go from 300 DPI to 1000 DPI.

Image Integrity Guidelines

The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) recommendations note that scientific misconduct includes deceptive manipulation of images. Figures submitted to the Journal of Dental Research should be minimally processed and should reflect the integrity of the original data in the image(s). Adjustments to images in brightness, contrast, or color balance should be applied equally to the entire image, provided they do not distort any data in the figure, including the background. Selective adjustments and touch-up tools used on portions of a figure are not appropriate. Images should not be layered or combined into a single image unless it is stated that the figure is a product of time-averaged data. All adjustments to image data should be clearly disclosed in the figure legend. Images may be additionally screened to confirm faithfulness to the original data. Authors are expected to supply raw image data upon request. Authors should also list tools and software used to collect image data and should document settings and manipulations in the Methods section.

These guidelines were derived from those provided by the Journal of Cell Biology and Nature:

<http://jcb.rupress.org/editorial-policies#data-integrity>

<https://www.nature.com/authors/policies/image.html>

Limit fonts used in any figure to Times, Times New Roman, Arial, Frutiger, and Sabon. Other fonts cannot be guaranteed to reproduce properly.

Files containing figures and tables should be clearly labeled to indicate their placement in the text or appendix. Tables should be viewable in a portrait view. Tables that are created in a landscape view are more suitable for an appendix.

If the online version is in color and the printed version in black and white, please submit separate files for each version. Figures should be identical except in color or grayscale. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the online version of JDR with no extra charges.

REFERENCES

The Journal of Dental Research (JDR) adheres to the CSE (8th Edition) editorial style. All submitted manuscripts should be

formatted in this style:
<http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSFCitation-Quick-Guide.html>.

SUPPLEMENTAL FILES

Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. All supplemental appendix files must be submitted with the manuscript for review.

Supplementary files will be subjected to peer-review alongside the article. Supplementary files will be uploaded as supplied. They will not be checked for accuracy, copyedited, typeset or proofread. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any supplementary material published. Supplementary files may include additional figures or tables that exceed the Journal's limit. Material intended for the supplemental appendix must have "supplemental" or "appendix" in the file name upon upload. When formatting your supplemental files, please follow these instructions:

- Authors should provide a single Word file with all Appendix content. Figures and tables should be included in the main Appendix file so they can appear immediately alongside their captions. High resolution figures may also be supplied separately if authors wish, but they also must be copied into the Word file so everything can be kept together.
- Be sure to run spell check and proofread the text.
- Remove all highlighting/other colors. Use one font throughout.
- The Appendix should include the title of the article and all authors. Page numbers are recommended.
- Figures and Tables should be labeled Appendix Figure/Table 1, Appendix Figure/Table 2, etc. Avoid labeling as S1, S2, and so forth.
- All table footnotes and figure legends should be included.
- Preferably, authors shouldn't label separate parts as "Appendix 1", "Appendix 2", etc.; just use section heads as in a regular article.

Language Editing: Manuscripts submitted for publication consideration should be written in English. Prior to submission, if a manuscript would benefit from professional editing, authors may consider using a language-editing service. Suggestions for this type of service can be found at www.iadr.org/EditingServices.

The Journal of Dental Research does not take responsibility for, or endorse these services, and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.

GENERAL INFORMATION FOR AUTHORS SUBMITTING A MANUSCRIPT PRIOR PUBLICATION

Manuscripts submitted to the Journal of Dental Research are accepted for consideration giving the understanding that it contains original material that has not been submitted for publication or has been previously published elsewhere. Any form of publication other than an abstract only constitutes prior publication.

ICMJE COMPLIANCE STATEMENT

Manuscript submission guidelines for the Journal of Dental Research follow the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” set forth by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). For additional information please visit the ICMJE web site at <http://www.icmje.org/>.

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) senhor (a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa **“Caracterização de cultura primária de células pulpares, gengivais e/ou da papila dentária apical de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C*”**. O objetivo desta pesquisa é compreender melhor a causa das alterações dos dentes e da gengiva que acontecem em pacientes com essas mutações genéticas. O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e durante a pesquisa e lhe garantimos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

Sua participação será por meio da doação de dente(s) com indicação de extração e/ou de fragmentos de gengiva, sabendo que o(s) procedimento(s) de extração do dente e/ou coleta da gengiva serão realizados por indicação terapêutica, para melhoria da sua saúde, como documentado em seu prontuário. Após conclusão dos experimentos, as células desses dentes e das gengivas serão guardadas e, caso sejam utilizadas em uma pesquisa futura relacionada a este estudo, o(a) senhor(a) será contatado para nova autorização. A parte dos dentes que não for utilizada na pesquisa será descartada.

Não haverá pagamento por sua colaboração. O(a) senhor(a) também não terá nenhum custo com a participação, mas caso haja alguma despesa diretamente relacionada ao projeto de pesquisa, esta será coberta pelo pesquisador responsável. O(a) senhor(a) pode se negar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento ou se recusar a participar de qualquer procedimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a).

As informações geradas pelo projeto de pesquisa serão usadas para compreender as alterações dentárias e gengivais que ocorrem na síndrome e, desta forma, sua participação é muito importante para ajudar a melhorar o tratamento e a qualidade de vida de pacientes com essa alteração genética. Esta pesquisa não oferece riscos ao (à) senhor (a). Se o(a) senhor(a) sente qualquer sofrimento emocional devido ao conceito de doação de uma amostra, nós estamos disponíveis

para conversar com o(a) senhor(a), respondendo às suas perguntas, e esclarecendo qualquer aspecto da pesquisa. Caso o(a) senhor(a) sofra dano decorrente da participação na pesquisa, receberá assistência imediata e integral pelo tempo necessário, bem como indenização, de acordo com as resoluções vigentes no Brasil.

_____ (Rubrica do participante)

_____ (Rubrica do pesquisador)

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados e/ou apresentados posteriormente em eventos e/ou revistas científicas, sempre mantendo o sigilo de sua participação.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O (a) senhor(a) tem total liberdade de pedir esclarecimentos e, caso tenha qualquer dúvida em relação à pesquisa e sempre que desejar ter acesso aos resultados, por favor telefone para Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe na Universidade de Brasília, telefone (61) 9854-9011, no horário de 08h às 12h e 14h às 18h. Informações sobre a aprovação desta pesquisa podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP-FM/UnB) pelo telefone 3107-1918.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) senhor(a).

Eu, _____
_____, autorizo a doação de meu(s) dente(s) e/ou fragmento de gengiva para pesquisa "**Caracterização de cultura primária de células pulpares, gengivais e/ou da papila dentária apical de pacientes com mutações nos genes *FAM20A* e *FAM20C***", ciente de que os procedimentos de extração do dente e/ou coleta da gengiva serão realizados por indicação terapêutica, como documentado em meu prontuário. Concordo com todos os itens abordados no termo de consentimento livre e esclarecido.

Assinatura do doador ou responsável – RG nº: _____

Assinatura do pesquisador responsável – RG nº _____

BRASÍLIA, _____ DE _____ DE _____.

ANEXO III

PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP/FM – UNB (967.387/2015)

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de cultura primária de células pulpares, gengivais e/ou da papila dentária apical de pacientes com mutações nos genes FAM20A e FAM20C

Pesquisador: Ana Carolina Aoevedo Poppe

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 34149814.1.0000.5558

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 967.387

Data da Relatoria: 27/01/2015

Apresentação do Projeto:

Mutações no gene FAM20A causam as síndromes de Amelogênese Imperfeita e nefrocalcinose (Enamel Renal Syndrome, ERS) e Amelogênese Imperfeita e fibromatose gengival. Os achados clínicos incluem nefrocalcinose bilateral, retenção de decíduos, hiperplasia gengival, calcificações pulpares e dentes decíduos e permanentes com amelogênese Imperfeita. Exames histológicos de folículos pericoronários mostraram ectomesênquima odontogênico hiperplásico com calcificações displásicas e ilhas de epitélio odontogênico. Já as mutações em homozigose ou heterozigose no gene FAM20C estão associadas à síndrome de Raine, uma displasia osteoesclerótica neonatal de início precoce e agressivo, que geralmente leva à morte ainda nas primeiras semanas de vida. Porém, relatos recentes têm descrito casos de sobrevida até a idade adulta. Várias manifestações bucais têm sido observadas nesses pacientes, em especial alterações gengivais, de esmalte, dentina e formação radicular. Com a

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fm@unb.br

Continuação do Protocolo: 967.367

finalidade de melhor compreender tais alterações, este estudo tem como objetivo estabelecer culturas primárias de células pulpares, gengivais e da papila apical de dentes de pacientes com mutações dos genes FAM20A e FAM20C e compará-las às culturas primárias de células da polpa dentária, papila apical e da gengiva de pacientes não síndrômicos (controle), para, assim, avaliar a viabilidade, o potencial de migração e cicatrização celular, a capacidade de diferenciação osteogênica e odontogênica e a expressão dos genes que codificam proteínas associadas ao controle da biomineralização em tecidos mineralizados e não mineralizados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar cultura primária de células pulpares, gengivais e da papila apical de dentes permanentes de pacientes com mutação nos genes FAM20A e FAM20C, atendidos na Clínica de Anomalias Dentárias, na Divisão de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília, e compará-la à cultura primária de células de polpa dentária, papila apical e gengiva de pacientes não síndrômicos (controle).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como benefício, espera-se que a pesquisa permita uma melhor compreensão das bases moleculares das alterações dentárias e gengivais desses pacientes e os riscos inerentes ao procedimento cirúrgico da extração dentária é mínimo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante que pode elucidar mecanismos das alterações dentárias e promover a qualidade de vida para esses pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados.

| | | |
|--|---------------------|--------------------|
| Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina | | |
| Bairro: Asa Norte | | CEP: 70.910-600 |
| UF: DF | Município: BRASÍLIA | |
| Telefone: (61)3107-1918 | | E-mail: fmd@unb.br |

Continuação do Parecer: 067.007

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme parecer anterior, identificou-se as seguintes pendências:

1. Definição da amostragem: a amostra será composta por 20 pacientes;
2. Idade dos participantes: definida e explorada no projeto de pesquisa: 13 a 28 anos;
3. Em havendo menores, definir e apresentar o termo de assentimento: termo foi apresentado, está adequado e encontra-se em anexo na plataforma Brasil.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 27 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Florêncio Figueredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-600
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1916 E-mail: fmd@unb.br