

Letícia Odaguri Watanabe

**Avaliação da senescência e do efeito do congelamento em
culturas primárias de células pulpares de paciente com
Síndrome de Raine**

Brasília
2019

Letícia Odaguri Watanabe

**Avaliação da senescência e do efeito do congelamento em
culturas primárias de células pulpares de paciente com
Síndrome de Raine**

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.

Orientador: Prof^ª. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe

Co-orientador: Prof^ª. Dra. Caroline Lourenço de Lima

Brasília
2019

À Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me abençoado e guiado nessa trajetória.

Aos meus pais, **Minoru e Sênia**, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, por terem abdicado de seus sonhos pelos meus e de minhas irmãs, e por todo o esforço investido em nossa educação. Às minhas irmãs **Larissa e Flávia**, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

À minha avó, **Tae**, e meus tios, **Orlando e Midori**, por sempre estarem dispostos a ajudar, por todo apoio e carinho.

À professora **Ana Carolina**, por ter despertado em mim a curiosidade pelo meio científico. Por todas as oportunidades proporcionadas durante esses anos no laboratório. Serei eternamente grata pelo tempo que trabalhamos juntas!

À **Carol**, pelo exemplo de profissional e pesquisadora, por todo o conhecimento transmitido e pela ótima coorientação.

Ao **Augusto**, por ter me ajudado na realização dos ensaios desse trabalho e por toda experiência transmitida.

Ao **Claúdio, Bruna e Lídia**, por toda ajuda e ensinamentos.

Aos professores **Edson, Eliete, Aline, Jaiane e Newton**, pela contribuição com a minha formação acadêmica e profissional.

Aos amigos do curso, **Marília, Lucas, Renato e Marina**, pelo convívio e por terem possibilitado que essa caminhada fosse mais alegre.

À banca, em especial à **Profª Lilian de Paula** e ao **Dr. Paulo Marcio Yamaguti**, por terem aceitado o convite de compô-la e pela oportunidade de ter suas contribuições nesse trabalho.

Agradeço a todos que fizeram parte dessa caminhada ao meu lado!

EPÍGRAFE

Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter,
método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao
começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.

São Tomás de Aquino

RESUMO

ODAGUIRI WATANABE, Letícia. Avaliação da senescência e do efeito do congelamento em culturas primárias de células pulpares de paciente com síndrome de Raine. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A síndrome de Raine (SR), pertencente às displasias osteoescleróticas, é uma doença rara, caracterizada pela presença de anomalias craniofaciais, calcificações ectópicas e alterações dentárias, tais como amelogenese imperfeita e defeitos dentinários. A SR é causada por mutações autossômicas recessivas no gene *FAM20C*, que codifica uma quinase responsável, entre outras funções, por fosforilar proteínas envolvidas com o processo de biomineralização. Nesse sentido, o estabelecimento de modelos experimentais faz-se importante para melhor compreensão das manifestações oro-dentais observadas nesses pacientes, além de possibilitar o surgimento de novas evidências que auxiliem em seu diagnóstico e tratamento. Em um estudo anterior realizado *in vitro* com células pulpares humanas (CPHs) de um paciente com SR que apresentava alterações dentinárias graves, foi observado que as células apresentavam morfologia alterada e capacidade proliferativa reduzida, sugerindo um fenótipo senescente. Contudo, por terem passado pelo processo de congelamento, a hipótese de que a senescência teria ocorrido pela criopresevação foi levantada. Diante disso, os

objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar se a criopreservação a -80°C altera o padrão de proliferação e senescência de CPHs de indivíduos saudáveis, 2) comparar o padrão de proliferação e senescência de CPHs de paciente com SR e indivíduos saudáveis. Para isso, foram estabelecidas culturas primárias de polpa dentária de 1 indivíduo com SR e de 4 indivíduos saudáveis para compor o grupo controle. Foram realizados os ensaios de tempo de dobra populacional (*Doubling Time*, DT), de β -galactosidase e expressão do gene *P21*, tanto nas células SR quanto nos controles, antes e após a criopreservação. A linhagem pulpar SR demonstrou padrão de DT e senescência similar ao dos controles, não houve diferença significativa nesses ensaios entre os grupos de CPHs congeladas e frescas. Em relação à expressão do gene *P21*, não houve diferença estatística entre controles frescos e criopreservados. Assim, diferente do que foi descrito anteriormente, sugere-se que a cultura primária de células pulpares do paciente SR avaliado apresentou padrão de proliferação e senescência semelhante ao de pacientes saudáveis e a criopreservação a -80°C parece não alterar o padrão de proliferação e a taxa de senescência de CPHs. Tais diferenças entre estudos podem ser atribuídas à heterogeneidade inerente às culturas primárias e ao fato das culturas serem provenientes de dentes de pacientes com mutações diferentes e com grau de patologia pulpar distinto.

ABSTRACT

ODAGIRI WATANABE, Leticia. Evaluation of senescence and the effect of cryopreservation in primary cultures of pulp cells of patient with Raine syndrome. 2019. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Raine syndrome (RS) is a rare osteosclerotic dysplasia characterized by the presence of craniofacial anomalies, ectopic calcifications and dental alterations such as amelogenesis imperfecta and dentin defects. RS is caused by autosomal recessive mutations in the *FAM20C* gene, which encodes a kinase responsible, among other functions, for phosphorylating proteins involved in the biomineralization process. In this sense, the establishment of experimental models is important to promote a better understanding of the oro-dental manifestations observed in these patients, and can help emerge new evidence to aid their diagnosis and treatment. In a previous study, primary human dental pulp cells (CPHs) of a patient with RS with severe dentin defects, showed altered morphology and reduced proliferative capacity, suggesting a senescent phenotype. However, since they were cryopreserved in freezer -80, the hypothesis that senescence could be a consequence of the cryopreservation conditions was raised. Therefore, the objectives of the present study were: 1) to evaluate whether cryopreservation at -80°C alters the pattern of proliferation and senescence of CPHs in healthy individuals, 2) to compare the pattern of CPHs proliferation and senescence in patients with RS and healthy individuals. For this, primary dental pulp cultures were established from 1 individual with SR and 4 healthy individuals in the control group. Population doubling time (DT), β -galactosidase and *P21* gene expression assays were

performed on both SR cells and controls before and after cryopreservation. The SR CPHs populations showed a pattern of DT and senescence similar to the controls cells, with no significant statistical difference in these assays between the frozen and fresh CPHs groups. Regarding *P21* gene expression, there was no significant statistical difference between fresh and frozen controls. Thus, it is suggested that the primary pulp cell culture of the assessed RS patient exhibit similar proliferation and senescence patterns as in healthy patients, and cryopreservation at -80°C does not appear to alter the proliferation pattern and senescence rate of CPH. The differences between these results and those previously obtained may be explained by the heterogeneity of the primary cultures, and by the inclusion of patients with different mutations with different degree of pulp pathology.

SUMÁRIO

Artigo Científico	17
Folha de Título	19
Resumo	20
Abstract	22
Introdução.....	24
Materiais e Métodos.....	27
Resultados.....	34
Discussão.....	44
Conclusão.....	47
Referências	47
Anexos.....	56
Anexo I: Normas da Revista.....	56
Anexo II: Parecer de Aprovação do CEP/FM.....	76
Anexo III: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	79

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

Watanabe, Letícia Odaguirj; Lima, Caroline Lourenço de; Acevedo, Ana Carolina. Avaliação da senescência e do efeito do congelamento em culturas primárias de células pulpares de paciente com Síndrome de Raine.

Apresentado sob as normas de publicação do Revista *Journal of Endodontics*.

FOLHA DE TÍTULO**Avaliação da senescência e do efeito do congelamento em culturas primárias de células pulpares de paciente com Síndrome de Raine**

Evaluation of senescence and the effect of freezing in primary cultures of pulp cells of patient with Raine Syndrome

Letícia Odaguiri Watanabe¹

Caroline Lourenço de Lima²

Ana Carolina Acevedo Poppe³

¹ Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília, Laboratório de Histopatologia Bucal.

² Cirurgiã Dentista, Doutora em Ciências da Saúde, Laboratório de Histopatologia Bucal, Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

³ Professora Associada, Laboratório de Histopatologia Bucal, Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Correspondência: Prof^a. Dra. 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: acevpoppe@gmail.com / Telefone: (61) 31071849

RESUMO

Avaliação da senescência e do efeito do congelamento em culturas primárias de células pulpares de paciente com Síndrome de Raine

A síndrome de Raine (SR), pertencente às displasias osteoescleróticas, é uma doença rara, caracterizada pela presença de anomalias craniofaciais, calcificações ectópicas e alterações dentárias, tais como amelogênese imperfeita e defeitos dentinários. A SR é causada por mutações autossômicas recessivas no gene *FAM20C*, que codifica uma quinase responsável, entre outras funções, por fosforilar proteínas envolvidas com o processo de biomineralização. Nesse sentido, o estabelecimento de modelos experimentais faz-se importante para melhor compreensão das manifestações oro-dentais observadas nesses pacientes, além de possibilitar o surgimento de novas evidências que auxiliem em seu diagnóstico e tratamento. Em um estudo anterior realizado *in vitro* com células pulpares humanas (CPHs) de um paciente com SR que apresentava alterações dentinárias graves, foi observado que as células apresentavam morfologia alterada e capacidade proliferativa reduzida, sugerindo um fenótipo senescente. Contudo, por terem passado pelo processo de congelamento, a hipótese de que a senescência teria ocorrido pela criopresevação foi levantada. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar se a criopresevação a -80°C altera o padrão de proliferação e senescência de CPHs de indivíduos saudáveis, 2) comparar o padrão de proliferação e senescência de CPHs de paciente com SR e indivíduos saudáveis. Para isso, foram estabelecidas culturas primárias de polpa dentária de 1 indivíduo com SR e de 4 indivíduos saudáveis para compor o grupo controle. Foram realizados os ensaios de tempo de dobra populacional (*Doubling*

Time, DT), de β -galactosidase e expressão do gene *P21*, tanto nas células SR quanto nos controles, antes e após a criopreservação. A linhagem pulpar SR demonstrou padrão de DT e senescência similar ao dos controles, não houve diferença significativa nesses ensaios entre os grupos de CPHs congeladas e frescas. Em relação à expressão do gene *P21*, não houve diferença estatística entre controles frescos e criopreservados. Assim, diferente do que foi descrito anteriormente, sugere-se que a cultura primária de células pulpares do paciente SR avaliado apresentou padrão de proliferação e senescência semelhante ao de pacientes saudáveis e a criopreservação a -80°C parece não alterar o padrão de proliferação e a taxa de senescência de CPHs. Tais diferenças entre estudos podem ser atribuídas à heterogeneidade inerente às culturas primárias e ao fato das culturas serem provenientes de dentes de pacientes com mutações diferentes e com grau de patologia pulpar distinto.

Palavras-chave

Síndrome de Raine; criopreservação; senescência celular; polpa dentária; proliferação celular.

Relevância Clínica:

A Síndrome de Raine é uma doença rara caracterizada por alterações dentárias e craniofaciais graves, como amelogênese imperfeita, defeitos da mineralização dentinária, hiperplasia gengival, micrognatia e palato ogival. O estabelecimento de modelos experimentais faz-se importante no sentido de promover melhor compreensão das manifestações oro-dentais observadas nesses pacientes, além de possibilitar o surgimento de novas evidências que auxiliem em seu diagnóstico e tratamento.

ABSTRACT

Evaluation of senescence and the effect of cryopreservation in primary cultures of pulp cells of patient with Raine syndrome

Abstract

Raine syndrome (RS) is a rare osteosclerotic dysplasia characterized by the presence of craniofacial anomalies, ectopic calcifications and dental alterations such as amelogenesis imperfecta and dentin defects. RS is caused by autosomal recessive mutations in the *FAM20C* gene, which encodes a kinase responsible, among other functions, for phosphorylating proteins involved in the biomineralization process. In this sense, the establishment of experimental models is important to promote a better understanding of the oro-dental manifestations observed in these patients, and can help emerge new evidence to aid their diagnosis and treatment. In a previous study, primary human dental pulp cells (CPHs) of a patient with RS with severe dentin defects, showed altered morphology and reduced proliferative capacity, suggesting a senescent phenotype. However, since they were cryopreserved in freezer -80, the hypothesis that senescence could be a consequence of the cryopreservation conditions was raised. Therefore, the objectives of the present study were: 1) to evaluate whether cryopreservation at -80°C alters the pattern of proliferation and senescence of CPHs in healthy individuals, 2) to compare the pattern of CPHs proliferation and senescence in patients with RS and healthy individuals. For this, primary dental pulp cultures were established from 1 individual with SR and 4 healthy individuals in the control group. Population doubling time (DT), β -galactosidase and *P21* gene expression assays were

performed on both SR cells and controls before and after cryopreservation. The SR CPHs populations showed a pattern of DT and senescence similar to the controls cells, with no significant statistical difference in these assays between the frozen and fresh CPHs groups. Regarding *P21* gene expression, there was no significant statistical difference between fresh and frozen controls. Thus, it is suggested that the primary pulp cell culture of the assessed RS patient exhibit similar proliferation and senescence patterns as in healthy patients, and cryopreservation at -80°C does not appear to alter the proliferation pattern and senescence rate of CPH. The differences between these results and those previously obtained may be explained by the heterogeneity of the primary cultures, and by the inclusion of patients with different mutations with different degree of pulp pathology.

Keywords

Raine syndrome; Cryopreservation; Cell senescence; Dental pulp; Cell proliferation

INTRODUÇÃO

A síndrome de Raine (SR) (OMIM #259775), pertencente as displasias osteoescleróticas, é uma doença rara, com prevalência estimada menor que 1/1.000.000 (1,2). É causada por mutações autossômicas recessivas no gene *FAM20C* do cromossomo 7p22.3, o qual desempenha importante função nos processos de biomineralização (1). Foi primeiramente descrita em 1989 por Raine *et al*, que relataram o caso de uma neonata que faleceu 86 minutos após o nascimento (3). Dentre os achados clínicos observados, destacam-se hipoplasia do terço médio da face, depressão da ponte nasal, exoftalmia, atresia das coanas, microcefalia, fontanelas aumentadas, osteoesclerose e calcificações intracranianas (4). Além disso, podem apresentar alterações oro dentais como amelogênese imperfeita, alterações dentinárias, hiperplasia gengival, micrognatia e palato ogival (5–9). Inicialmente, foi descrita como uma síndrome letal onde os indivíduos afetados pela doença faleciam ainda no período neonatal, devido à insuficiência respiratória causada pela má-formação torácica. Entretanto, uma forma não-letal da SR foi relatada pela primeira vez em 2009 e compreendeu a descrição de dois indivíduos afetados pela doença que sobreviveram à infância (6). Desde então, novos casos de SR não-letal têm sido relatados, confirmando a existência de um fenótipo mais brando da síndrome (6–14). Até o presente, aproximadamente 45 casos de SR foram relatados na literatura, sendo a maioria casos letais (1,3,12–21,4,22–31,5–11).

Juntamente com *FAM20A* e *FAM20B*, a caseína quinase *FAM20C* compõe a “família com similaridade de sequência 20” (*Family with sequence similarity 20*, *FAM20*), sendo responsável por fosforilar principalmente proteínas com o motivo Ser-x-Glu/pSer, o qual é encontrado na família de glicoproteínas *SIBLINGs* (*small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins*) e no hormônio *FGF23*

(*fibroblast growth factor 23*) (32,33). As glicoproteínas SIBLINGs fazem parte da família de fosfoproteínas secretoras cálcio-ligantes (SCPP, *secretory calcium-binding phosphoproteins*) e são codificadas por um grupo de 5 genes (*OPN, DMP1, BSP, MEPE, DSPP*) envolvidos na mineralização de ossos e dentes. Por isso, sugere-se que pacientes com SR apresentam um desequilíbrio no processo de biomineralização (32). Além disso, alguns pacientes apresentam hipofosfatemia e hiperfosfatúria devido à ausência de regulação negativa no FGF23 pela FAM20C, ou seja, o hormônio inibe a reabsorção renal do fosfato, aumentando assim, a sua excreção (8,34).

Em 2015, Acevedo *et al* relataram 5 casos de SR não-letal de 2 famílias (Família 1; c.784+5G>C; Família 2; c.1487C>T p.Pro496Leu) não relacionadas acompanhados na Clínica de Anomalias dentárias da divisão de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Em relação as alterações sistêmicas e dentárias observadas em ambas famílias, se destacam a exoftalmia, hipoplasia do terço médio da face, palato ogival, má-oclusão, hiperplasia gengival, calcificações ectópicas em gengiva, folículo e polpa dentária, amelogênese imperfeita, defeitos dentinários e lesões periapicais (9). Na dissertação de mestrado, Cantarutti caracterizou cultura primária de células pulpares (CPHs) de um paciente com SR (Família 2; c.1487C>T p.Pro496Leu) previamente relatado por Acevedo *et al*, 2015. Após realização de ensaios de atividade mitocondrial e análise da morfologia celular, foi observado que as células mutadas apresentavam citoesqueleto alterado e menor capacidade de proliferação ou viabilidade celular, sugerindo que as células SR poderiam estar em processo de senescência (35).

A senescência celular é um processo natural de envelhecimento que ocorre devido à interrupção do ciclo celular. Esse processo acontece por dois principais motivos, o primeiro dá-se via encurtamento dos telômeros, quando as células atingem um

número máximo de divisões, denominada senescência replicativa, enquanto a segunda é a senescência prematura induzida por estresse oxidativo ou inflamatório (36). Conforme as células entram em senescência, algumas proteínas envolvidas com a parada do ciclo celular são expressas. Dentre elas, o inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKI) P21(CDKN1a), o qual pode ser utilizado como biomarcador para determinação de células senescentes. Outro biomarcador bastante utilizado é a enzima β -galactosidase (β -gal) que encontra-se superexpressa no interior dos lisossomos de células em senescência (37–39).

A cultura celular é amplamente utilizada como ferramenta experimental para melhor entender o comportamento dos diferentes tipos celulares. Para que células de culturas primárias possam ter uso posterior, elas devem ser criopreservadas logo nas primeiras passagens a fim de manter seu potencial proliferativo, sem que entrem no processo de envelhecimento (40). A criopreservação é uma técnica que utiliza baixas temperaturas para preservar estruturalmente intactas as células vivas, evitando assim perdas por contaminação, além de minimizar mutações em passagens contínuas (41). Os protocolos de criopreservação incluem dois principais métodos: congelamento lento convencional e vitrificação ou criopreservação sem gelo. O primeiro normalmente implica em resfriamento das amostras a taxas de 1-2°C por minuto, enquanto o segundo é um processo de resfriamento no qual a solução se solidifica rapidamente sem a formação e crescimento de cristais de gelo, devido à combinação de um resfriamento ultrarrápido com uma alta concentração de soluto (42). A preservação no congelamento convencional é obtida pela adição de crioprotetores, os quais são responsáveis por reduzir as agressões do resfriamento, através da penetração nas células, com baixa toxicidade (43). Os crioprotetores podem ser definidos como “qualquer aditivo que possa ser fornecido às células antes do congelamento e que gerem maior sobrevivência

pós-descongelamento do que seria obtida na sua ausência” (44). Eles podem ser agrupados em duas categorias: 1) permeáveis à membrana, composto pelo dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e 1,2-propanodiol; 2) não-permeáveis à membrana, composto por 2-metil-2,4-pentanodiol e polímeros como polivinil pirrolidona, hidroxietilamido entre outros açúcares (45).

Embora a criopreservação seja importante para preservação da amostra, permitindo uso futuro, alguns estudos sugerem que, quando realizada de forma inadequada ou a longo prazo, a criopreservação pode levar a alterações celulares, tais como instabilidade fenotípica, morte celular, redução da viabilidade e capacidade proliferativa, além de senescência (46,47).

Uma vez que as células SR avaliadas no trabalho de Cantarutti passaram pelo processo de congelamento, a hipótese de que a senescência teria ocorrido pela criopreservação foi levantada. Sendo assim, os objetivos gerais do presente estudo foram: 1) avaliar se a criopreservação a -80°C altera o padrão de proliferação e senescência de CPHs de indivíduos saudáveis, 2) comparar o padrão de proliferação e senescência de CPHs de células pulpares de paciente com SR (Família 1; c.784+5G>C) e de indivíduos saudáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP/FM-UnB), parecer 967.387/2015 (Anexo 2). O presente trabalho foi desenvolvido como parte do mestrado do aluno Augusto Pereira Resende defendido em dezembro de 2018 no programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, FS-UnB. Foram estabelecidas culturas primárias de CPHs de uma paciente de 24 anos, com mutação em homozigose no gene *FAM20C* (Família 1; c.784+5G>C), acompanhada na Clínica de Anomalias

Dentárias da Divisão de Odontologia da Hospital Universitário de Brasília (HUB) e previamente relato por Acevedo *et al*, 2015. A fim de compará-la com um grupo controle, foram estabelecidas quatro culturas de CPHs de pacientes saudáveis com idade entre 20 e 25 anos, dos sexos feminino e masculino.

As culturas de células, composta principalmente por fibroblastos e células ectomesenquimais indiferenciadas, foram obtidas a partir da polpa dentária de terceiros molares com indicação de extração, cedida pelos pacientes, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), seguindo as recomendações da Resolução 196/96 do CNS (Anexo 3).

Cultura de células

Após a extração, os dentes foram transferidos para tubos cônicos do tipo Falcon™ de 15 mL (*Corning Incorporation*, Lowell, MA, EUA) contendo 5 mL de meio de cultura completo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (*Gibco®*, *Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) gelado, com 20% de soro fetal bovino (SFB) (v/v) (*Invitrogen*), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1% de anfotericina B (*Gibco®*). Após limpeza da superfície, os dentes foram fraturados com auxílio de cinzel e martelo cirúrgico, a polpa foi removida e transferida para capela de fluxo laminar. A cultura foi obtida por meio da técnica de explante. O tecido pulpar foi lavado com o meio de cultura completo e transferido para placas de cultura de 35 mm (*Corning*), onde foi seccionado com lâminas de bisturi nº 15. Lâminulas de vidro estéreis foram colocadas sobre os pequenos fragmentos obtidos, a fim de estabilizá-los na placa. O tecido foi cultivado em 2 mL de meio de cultura anteriormente descrito. 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 dois dias. Após atingirem um grau de total confluência, as células foram

transferidas para placas de 100 mm (*Corning*), contendo meio DMEM com 10% de SFB e antibióticos, para adquirir uma maior quantidade de células e, a partir da segunda passagem, foi estabelecido um estoque de cada linhagem, criopreservado com solução de congelamento constituído por SFB e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (v/v) (*Sigma-Aldrich*). Os tubos criogênicos (*Corning*) contendo as células foram armazenados em freezer, a -80°C, e conservadas por um período aproximado de 6 e 12 meses. A partir da terceira passagem, foram realizados os ensaios de DT e de atividade da β -galactosidase. Ao atingir a confluência, as placas foram aspiradas e lavadas com PBS a fim de eliminar o meio DMEM, em seguida as células foram incubadas (37°C, 2 minutos) com 2 mL de solução de tripsina a 0,5 % (p/v) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) e 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (*Sigma-Aldrich*) para remoção da camada aderida à placa. Para inativar a ação da tripsina, adicionou-se às placas 5 mL de meio DMEM com SFB a 10%. As células ressuspensas foram coletadas e transferidas para tubos cônicos do tipo Falcon™ de 50 mL e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Após a formação do *pellet*, o meio foi vertido em um recipiente para descarte e 20 mL de meio DMEM com SFB a 10% foram adicionados ao tubo cônico do tipo Falcon™ de 50 mL para homogeneização. Em seguida, uma alíquota de 10 μ L foi aplicado na câmara de *Neubauer* para contagem de células utilizando o microscópio óptico de luz invertida (*Zeiss Primo Vert*) em objetiva de 20x. Após a contagem, foram plaqueadas $1,0 \times 10^6$ de células em 2 placas de 100 mm (5×10^5 /placa), de cada linhagem, com 8 mL de meio DMEM e SFB a 10%.

Ensaio de Tempo de dobra populacional (DT)

Para o ensaio do tempo de dobra populacional (DT), células frescas e criopreservadas foram cultivadas por um período de 7

dias, sendo a troca de meio realizada a cada 2 dias, e o DT foi obtido por meio da diferença da quantidade de células plaqueadas ($1,0 \times 10^6$) e a quantidade de células coletadas, conforme a fórmula abaixo, proposta por Roth, V., em 2006 (48).

$$\text{Tempo de dobra populacional} = \frac{\text{duração} \times \log(2)}{\log(\text{quantidade final}) - \log(\text{quantidade inicial})}$$

Após a coleta, as células foram contadas e plaqueadas novamente conforme descrito anteriormente, para a realização dos ensaios nas outras passagens. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon pareado ($P < 0,05$).

Ensaio colorimétrico de atividade da enzima β -galactosidase

No ensaio de senescência que avalia a atividade da enzima β -galactosidase, células frescas e criopreservadas foram plaqueadas em duplicata ($N=2$) em placas de 24 poços (15×10^3 células/poço). Após 48 horas, foi realizado o ensaio utilizando-se o kit *Senescence β -Galactosidase Staining* e seguindo as recomendações do fabricante. Os poços foram aspirados e lavados com PBS, em seguida, as células foram fixadas com 250 μL de solução fixadora (25 μL de solução fixadora e 225 μL de água destilada/poço) durante 15 minutos. Após isso, os poços foram lavados duas vezes com PBS para que, em seguida, recebessem a solução corante (209,25 μL de água destilada, 23,25 μL de solução corante, 12,5 μL de X-Gal e 2,5 μL de solução A e B/poço). Por fim, a placa foi selada com película flexível, semitransparente com ação aderente para evitar a evaporação das soluções, envolvida por papel alumínio, para manter a ausência de luz e incubada em condições ótimas (37°C , 5% de CO_2 e umidificada) por 24 horas. A contagem das células coradas foi realizada a partir de imagens (1 imagem por cada poço) obtidas

com microscópio de contraste de fase *Axio Observer D1* (Zeiss) em aumento de 5x, utilizando-se o programa *ImageJ* (Wayne Rasband) e o valor obtido foi normalizado pela estimativa da dobra populacional (DP), ou seja, a quantidade de vezes que a população de cada linhagem duplicou durante 7 dias. Cada microfotografia foi contada 2 vezes separadamente, por 2 operadores, totalizando 4 contagens por imagem. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$). Os ensaios de DT e de atividade da β -Galactosidase foram realizados a partir da terceira passagem até o esgotamento da capacidade proliferativa ou inviabilidade técnica.

Ensaio de expressão do gene *P21* por RT-qPCR

O ensaio de expressão gênica foi realizado para verificar a expressão relativa de um gene do ciclo celular, *P21*, relacionado com o processo de senescência. Para esse ensaio, foi utilizado o kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific) além dos pares de primers (todos fornecidos pelo IDT®, Integrated DNA Technologies) para os genes *P21* (CDKN1A) e *BETA ACTINA* (ACTB; constitutivo e normalizador das reações). Células frescas e criopreservadas na quinta passagem foram semeadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/poço) e cultivadas em 2 mL de meio de cultura (DMEM com SFB a 10%) por 3 dias. Posteriormente, as células foram coletadas para extração do RNA total. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen) e respeitando as recomendações do fabricante. Assim, nas placas de 6 poços, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com solução PBS e, em seguida, 1 mL de TRIzol® foi adicionado em cada poço. O conteúdo foi homogeneizado, coletado, transferido para tubos de 1,5 mL e estes foram armazenados em freezer a -80°C . Para dar prosseguimento à extração, as amostras foram descongeladas em

gelo, incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos e misturadas com 200 μL de clorofórmio (*Sigma-Aldrich*). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vórtex, mantido por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao final desse processo, houve a separação da amostra em 3 fases: RNA, DNA e proteínas. A fase incolor superior, correspondente ao RNA total, foi coletada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 500 μL de isopropanol (*Sigma-Aldrich*) para precipitação do RNA. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v), centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos a 4°C, seco a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e ressuspenso em 30 μL de água deionizada (milli-Q) estéril tratada com 0,1% (p/v) de dietilpirocarbonato (DEPC; *Sigma-Aldrich*). As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C. O RNA total foi quantificado por meio de espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm utilizando o aparelho *NanoVue Plus* (*GE Healthcare Life Sciences*). A concentração foi representada em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a pureza (grau de contaminação por proteína) foi analisada por meio da razão A260/A280, sendo utilizadas, preferencialmente, as amostras cujo valor da razão ficou entre 1,6 e 2,2. Para eliminar possíveis contaminações das amostras por DNA genômico, alíquotas de 0,4 μg de RNA total foram tratadas com 1 unidade/ μL de DNase I (*Sigma-Aldrich*), seguindo a recomendação do fabricante. Depois do tratamento com DNase, foi realizada a transcrição reversa das fitas simples de RNA em DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), seguindo também as instruções do fabricante. Para realização da qPCR, foi utilizado o kit *PowerUp SYBR Green*

Master Mix (Thermo Fischer Scientific) além do par de *primers* (fornecido pelo IDT®, *Integrated DNA Technologies*) para o gene *P21* (*CDKN1A*) e *BETA ACTINA* (*ACTB*; constitutivo e normalizador das reações). Os desenhos dos *primers* foram obtidos a partir do banco de *primers* *PrimerBank* (49) e testados *in sílica* por meio da comparação com as sequências disponíveis no banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa *Primer-BLAST*. A eficiência e a especificidade foram garantidas por validação através de curva de diluição e curva de *melting*. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*Applied Biosystems*). Uma reação sem amostra de cDNA (controle negativo) foi realizada para cada par de *primers*, a fim de se descartar qualquer possibilidade de contaminação. As amostras foram amplificadas no termociclador *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System* seguindo o protocolo de ciclagem fornecido pelo fabricante do kit. Ao final da reação, os dados foram obtidos com o programa *Software StepOne v2.1* (*Thermo Fischer Scientific*). A quantificação relativa do gene foi realizada utilizando o método de comparação do Ct (*cycle threshold*, ou ciclo limiar) ou $\Delta\Delta Ct$ (50). Os valores de Ct obtidos para o gene *P21* foi normalizado em função do gene de referência (β -actina), subtraindo o Ct do gene de interesse pelo Ct do gene da β -actina (ΔCt). Em seguida, o ΔCt das amostras foi subtraído pelo ΔCt da amostra calibradora (grupo controle), obtendo-se o $\Delta\Delta Ct$. A expressão relativa dos genes correspondeu ao resultado da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (92). Os dados utilizados na análise estatística da expressão gênica foram os valores de $-\Delta Ct$ (51), teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Foram estabelecidas culturas primárias de 4 indivíduos saudáveis, C1, C2, C3 e C4 para compor o grupo controle e de um paciente com SR (c.784+5G>C). Os ensaios de DT e de atividade da β -galactosidase foram realizados na linhagem SR e nos controles, antes e após a criopreservação a -80°C por aproximadamente 6 (C1-C4) e 12 meses (C2 e SR). O ensaio de expressão gênica do *P21* foi realizado com as culturas controles frescas (C1-C4) e criopreservadas por 6 (C1-C4 e SR)..

Análise da proliferação celular

Por meio do DT, após 7 dias, foi possível observar um padrão de proliferação heterogêneo nas culturas controle (C1-C4) frescas e criopreservadas por 6 meses. A análise estatística não demonstrou diferença significativa ($p>0,05$) entre as populações analisadas. Entretanto, C1 e C4 apresentaram uma maior variabilidade no padrão de DT nas passagens avaliadas, ao contrário de C2 e C3 que se mantiveram estáveis, tanto para o grupo de células frescas, quanto para as criopreservadas (Figura 1). Por conta disso, a cultura C2 foi utilizada para avaliar o efeito do congelamento por aproximadamente 12 meses e, da mesma forma, apresentou um padrão de DT similar em todas as passagens analisadas (Figura 2).

Assim como observado nas populações controle, a cultura SR também não apresentou diferença estatística no DT das CPHs frescas e criopreservadas (por aproximadamente 12 meses) nas passagens 3-7, embora se observe um aumento do DT na passagem 7 para o grupo fresco (Figura 3).

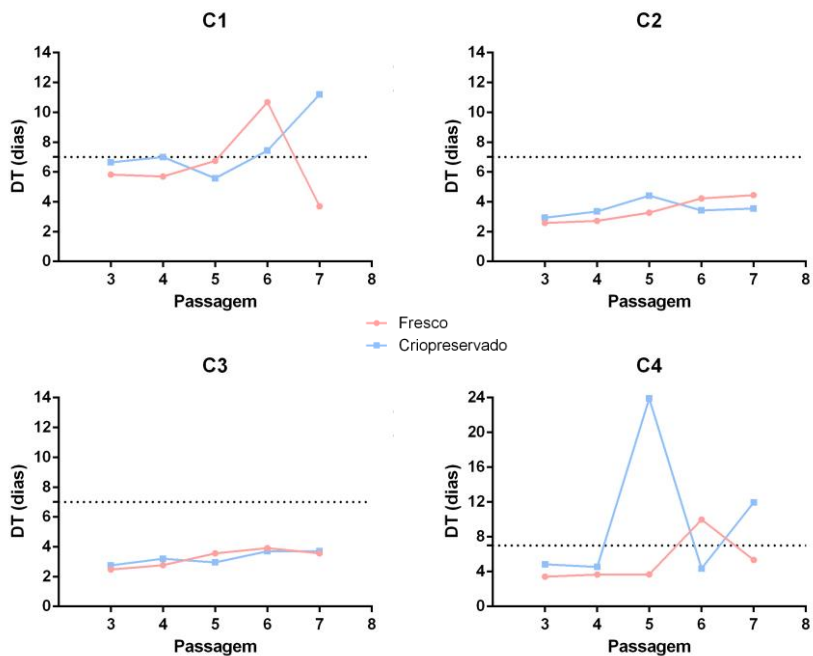


Figura 1: Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT, em dias) das culturas controle frescas e criopreservadas (por aproximadamente 6 meses) nas passagens 3, 4, 5, 6 e 7. A linha tracejada (dia 7) representa o DT a partir do qual as células são consideradas senescentes. n=1 para cada passagem celular.

C2 (Fresco x Criopreservado >12 meses)

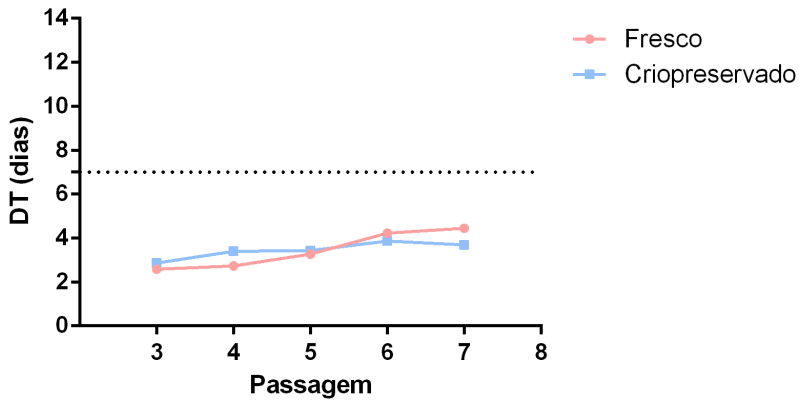


Figura 2: Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT, em dias) da população controle 2 (C2) fresca e congelada (aproximadamente 12 meses) nas passagens 3, 4, 5, 6 e 7. A linha tracejada (dia 7) representa o DT a partir do qual as células são consideradas senescentes. n=1.

SR (Fresco x Criopreservado >12 meses)

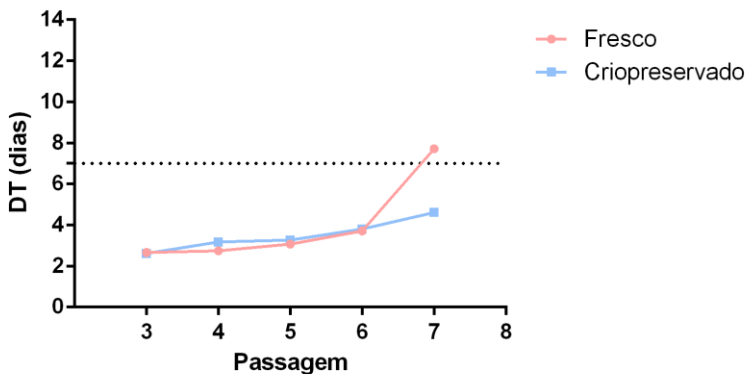


Figura 3: Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT, em dias) da população SR fresca e criopreservadas (por aproximadamente 12 meses) nas passagens 3, 4, 5, 6 e 7. A linha tracejada (dia 7) representa o DT a partir do qual as células são consideradas senescentes. n=1.

Quando comparada com C2, as células SR (todas criopreservadas por aproximadamente 12 meses) apresentaram DT muito similares aos controles, exceto para passagem 7, na qual se observa um DT ligeiramente maior para o grupo SR (Figura 4).

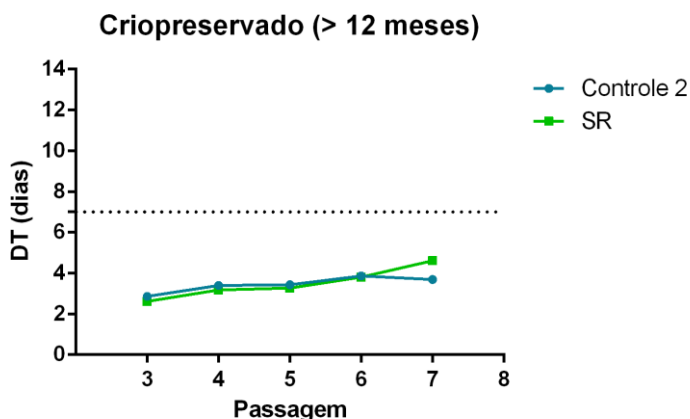


Figura 4: Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT, em dias) do controle (C2) e da população SR criopreservada por aproximadamente 12 meses nas passagens 3, 4, 5, 6 e 7. A linha tracejada (dia 7) representa o DT a partir do qual as células são consideradas senescentes. n=1 para cada linhagem celular.

Análise da senescência pela atividade enzimática da β -galactosidase

Por meio do ensaio de atividade da enzima β -galactosidase, foi possível observar que as populações submetidas ao congelamento, por aproximadamente 6 meses, apresentaram uma maior quantidade de células coradas em relação às células frescas principalmente na passagem 7. Ao comparar o número de

células coradas entre as passagens, foi observada uma maior marcação na passagem 7, em relação às passagens 3 e 5, tanto para as culturas frescas quanto para criopreservadas. Entretanto, ao realizar a análise estatística, notou-se que não houve diferença significativa quando comparadas as populações controle frescas e congeladas, nas passagens analisadas (Figura 5).

Quando comparados com a população SR fresca, os controles apresentaram menor porcentagem de células coradas, porém sem diferença estatística significativa (Figura 6). O mesmo ocorreu ao se comparar C2 com SR, ambos criopreservados por aproximadamente 12 meses (Figura 7).

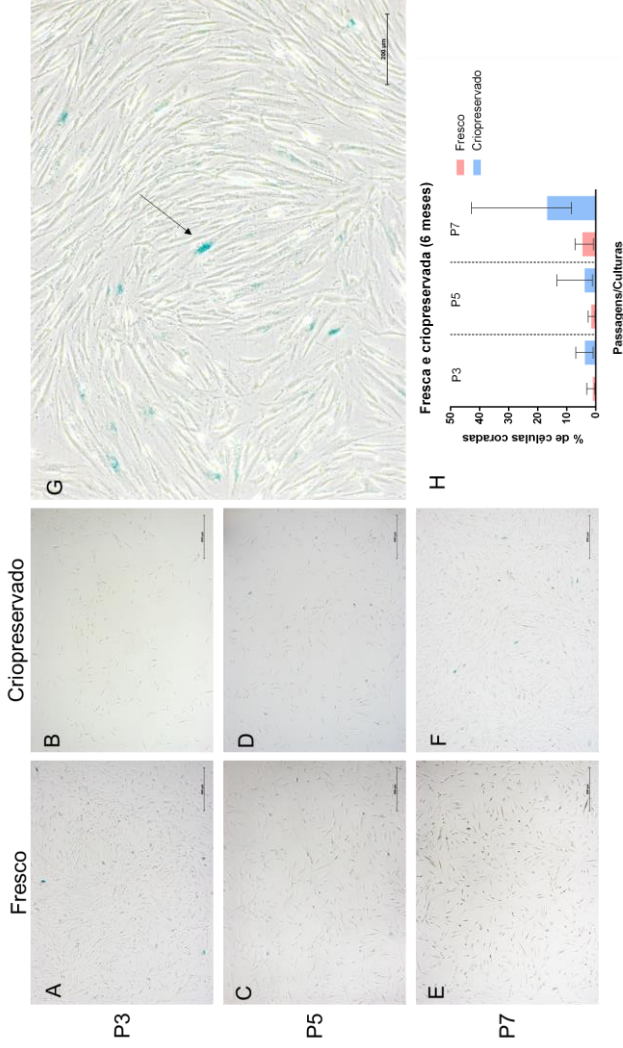


Figura 5: Fotomicrografias (A-G) e representação gráfica (H) de ensaio atividade da enzima beta-galactosidase de CPHs (C1-C4) frescas (A, C, E) e criopreservadas (B, D, F) por aproximadamente 6 meses. Fotomicrografia em maior aumento de células criopreservadas (P7) e coradas em azul evidenciando atividade enzimática (G; seta). n=4 por grupo, por passagem celular. Sem significância estatística. Dados apresentados como mediana e amplitude por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$).

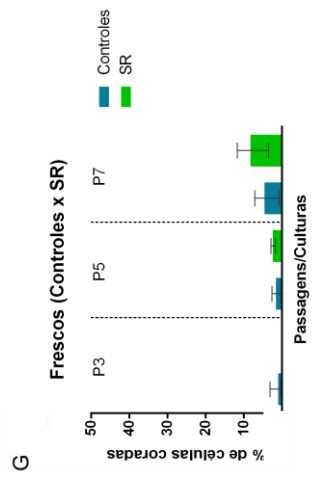
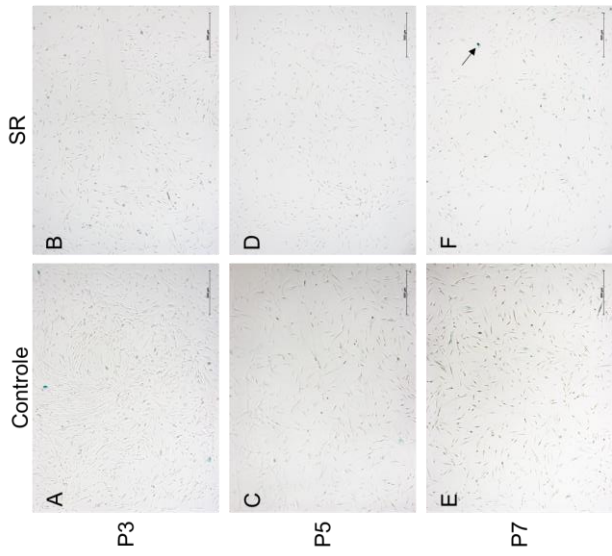


Figura 6: Fotomicrografias (A-F) e representação gráfica (G) de ensaio de atividade da enzima beta-galactosidase de CPHs C1-C4 (A, C, E) e SR (B, D, F) frescos. Sem significância estatística. Dados apresentados como mediana e amplitude por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$).

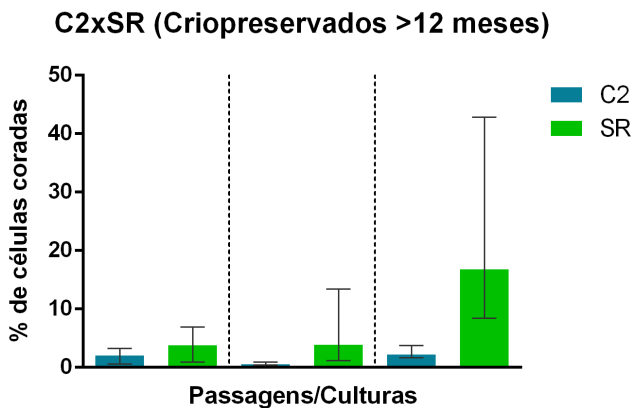


Figura 7: Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da enzima beta-galactosidase de C2 e SR. n=1 por grupo, por passagem celular. Dados apresentados como mediana e amplitude. $p > 0,05$ por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn.

Análise da expressão relativa do *P21*

A análise da expressão relativa do RNA mensageiro do gene *P21*, relacionado com a senescência, não demonstrou diferença significativa entre os controles frescos, congelados por 6 e 12 meses aproximadamente (Figura 8), assim como ocorreu quando se comparou os controles (C1-C4) com SR frescos e criopreservado por 6 meses (Figura 9).

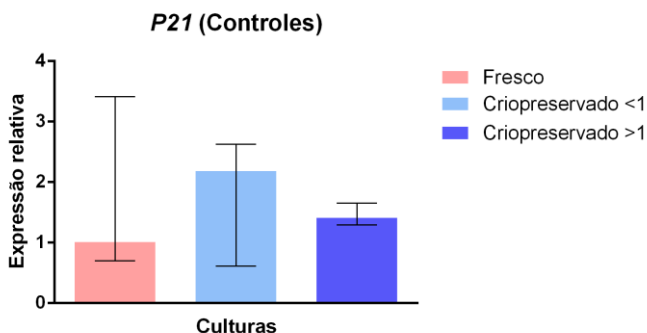


Figura 8: Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro, na passagem 5, obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado nas culturas controle frescas e criopreservadas por aproximadamente 6 (C1-C4) e 12 meses (C2). As células foram semeadas em placas de 6 poços, cultivadas por 3 dias e, após, coletadas para extração do RNA total seguida de RT-qPCR. n= 4 por grupo. Dados apresentados como mediana e amplitude da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

p > 0,05 por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

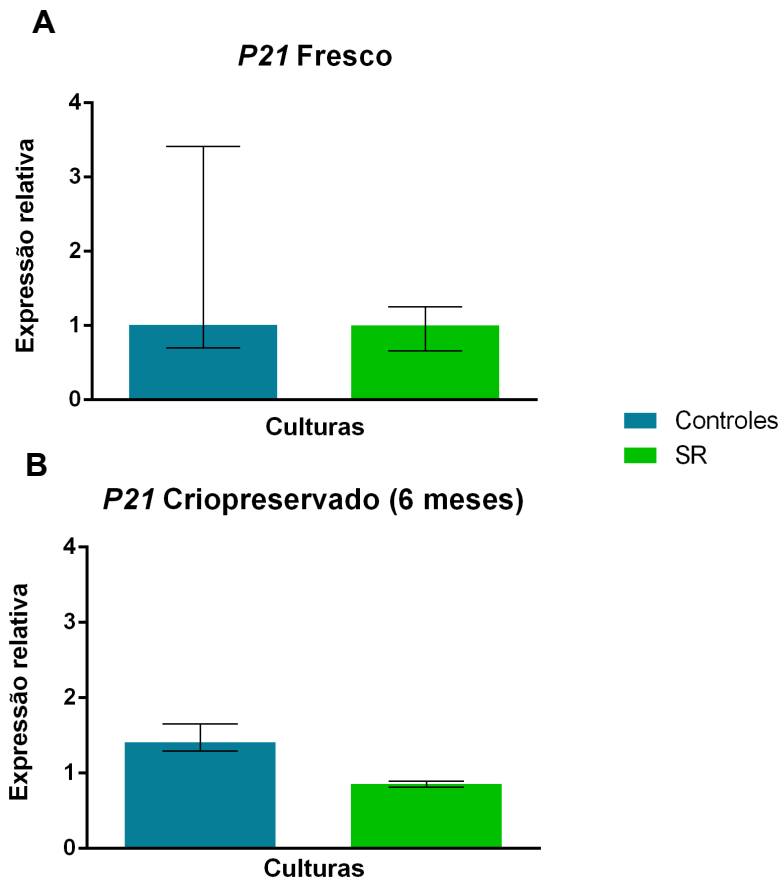


Figura 9: Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro, na passagem 5, obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado nas culturas controle (C1-C4) e SR frescas (A) e criopreservadas por aproximadamente 6 meses (B). As células foram semeadas em placas de 6 poços, cultivadas por 3 dias e, após, coletadas para extração do RNA total seguida de RT-qPCR. n= 4 por grupo. Dados apresentados como mediana e amplitude da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). $p > 0,05$ por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

Com o intuito de melhor entender as características observadas por Cantarutti em 2016, onde foi sugerido que CPHs de um paciente com SR (Família 2; c.1487C>T p.Pro496Leu) eram senescentes por apresentarem morfologia alterada e capacidade proliferativa reduzida, foi estabelecida uma nova cultura primária de outro paciente com SR (Família 1; c.784+5G>C) não relacionado com a primeira família. A partir dessa cultura, foram realizados ensaios para avaliar a capacidade proliferativa, senescência e expressão do gene *P21*. Por terem passado pelo processo de criopreservação, a hipótese de que a senescência poderia ser causada pela criopreservação também foi levantada, visto que alguns estudos demonstram que as condições de criopreservação e descongelamento, assim como a temperatura e os crioprotetores utilizados poderiam causar estresse celular, levando a senescência (47,52,53). Assim, os objetivos do estudo foram avaliar se a criopreservação a -80°C altera o padrão de proliferação e senescência das CPHs controle e comparar o padrão de proliferação e senescência do paciente SR com os controles.

Para avaliar o efeito do método de congelamento em freezer a -80°C utilizado no laboratório, foram estabelecidas 4 culturas primárias de indivíduos saudáveis (C1-C4) e de 1 indivíduo com SR (c.784+5G>C), por meio da técnica de explante, devido a simplicidade de execução e baixo custo (54,55). Foram estabelecidas culturas da paciente SR da família 1 relatada por Acevedo et al, 2015, devido à falta de CPHs frescas do paciente SR da família 2 relatado por Cantarutti, em 2016. A paciente e seus dois irmãos afetados apresentam mutação recessiva em sítio de *splicing* com fenótipo dentário atenuado em relação aos dois irmãos da família 2.

O ensaio de DT foi utilizado para avaliar a capacidade proliferativa das CPHs controle e SR, frescas e congeladas, por aproximadamente 6 e 12 meses. Este ensaio consiste no cálculo estimado do tempo necessário para que determinada população realize uma dobra populacional (56). Nesse estudo, quando os valores de DT das CPHs controle frescas e criopreservadas, por aproximadamente 6 meses, foram comparados, observou-se que elas apresentaram dois padrões distintos, duas populações apresentaram DTs que variaram ao longo das passagens analisadas (C1 e C4), enquanto as outras duas mantiveram valores similares da terceira até a sétima passagem (C2 e C3). Entretanto, após a análise estatística entre as populações frescas e congeladas, foi observado que não houve diferença significativa. Até o presente, não foram encontrados estudos que avaliassem os valores de DT de cultura primária de CPHs. Contudo, em um estudo de caracterização de células-tronco pulpares, foram obtidos valores de DT de 15-50 horas (57), diferente dos valores de DT encontrados nas CPHs controles desse trabalho, que se mantiveram na sua maioria entre 2 e 4 dias, exceto para as populações C1 e C4, que tiveram DT de 12 e 24, respectivamente, em uma determinada passagem. Esse padrão aumentado e não esperado de DT poderia ser atribuído a algum erro isolado de metodologia ou a algum padrão específico dessas linhagens nessas passagens. A repetição desses experimentos se faz necessária para confirmar o padrão de DT dessas populações. Um dos controles (C2) foi utilizado para avaliar o efeito da criopreservação por aproximadamente 12 meses, e assim como observado anteriormente, ele apresentou um crescimento linear e com valores de DT mais baixos que C1 e C4. O ensaio também foi realizado nas CPHs SR, onde foram avaliados os valores de DT fresco e após criopreservação por aproximadamente 12 meses. Da mesma maneira que C2 e C3, as células SR mantiveram valores similares nas passagens analisadas, exceto na passagem

7. Dessa forma, dois padrões de proliferação foram observados, um irregular e com valores de DT mais elevados (C1 e C4) e outro com crescimento linear e valores de DT mais baixos (C2, C3 e SR).

A senescência celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de atividade da enzima β -galactosidase, a qual é encontrada em maior quantidade nos lisossomos de células senescentes (58). Em 2013, Itahana *et al*, sugeriram que 80% dos fibroblastos devem estar corados para que a cultura seja considerada senescente (59). Todavia, as CPHs frescas e criopreservadas por aproximadamente 6 e 12 meses, do presente estudo, apresentaram valores inferiores a 50%. Esses resultados sugerem que o método de criopreservação utilizado não teve efeito sobre a senescência celular e que tanto as culturas frescas quanto congeladas, nas passagens analisadas, não estavam senescentes. Porém, é importante observar que, a despeito da ausência de marcação superior a 50%, houve um aumento gradual de células coradas com o aumento das passagens celulares. Além disso, ao se analisar os grupos controle e SR na passagem 7, este apresentou maior marcação em relação ao grupo controle. Assim, esses resultados apontam para a importância de se trabalhar com culturas primárias em passagens menores, principalmente de pacientes com SR. Uma vez que a passagem 5 apresentou valores de DT e beta-gal menores e mais homogêneos entre todos os grupos e considerando que a expansão até essa passagem viabiliza células suficientes para realização de ensaios experimentais, sendo, portanto, uma passagem bastante utilizada na rotina laboratorial, ela foi escolhida para realização dos experimentos de expressão gênica do *P21* (CDKN1A). A via p53/p21 é uma das principais vias de sinalização envolvidas com o processo de senescência celular, a p53 é uma proteína efetora que identifica os danos causados no DNA e ativa a p21, a qual é uma inibidora de ciclina depende de

quinase (CKI) que está relacionada com a via de interrupção do ciclo celular (37). A análise estatística revelou não haver diferença significativa entre os grupos analisados. Esses dados corroboram os resultados obtidos com o ensaio da beta-galactosidase e, em conjunto, sugerem que a criopreservação por 6 e 12 meses não é capaz de induzir senescência nas CPHs, pelo menos para culturas primárias expandidas até a quinta passagem. Além disso, culturas primárias de células SR apresentam padrão de proliferação e senescência similar ao de culturas de indivíduos controle, ao menos para passagens menores ou iguais a quinta.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos apresentados por Cantarutti, em 2016. Nesse estudo os resultados não sugerem alterações nas propriedades biológicas relacionadas a proliferação celular e senescência. Os ensaios realizados não foram os mesmos que Cantarutti et al, 2016 já que nesse procurou-se avaliar de forma mais profunda a senescência. Porém, deve ser considerado na interpretação dos resultados a heterogeneidade das culturas primárias assim como elas serem provenientes de pacientes SR com mutações diferentes e com grau de patologia pulpar distinto.

CONCLUSÃO

Sugere-se que no presente estudo a cultura primária de células pulpares do paciente SR avaliado apresenta padrão de proliferação e senescência semelhante ao de pacientes saudáveis e a criopreservação a -80°C parece não alterar o padrão de proliferação e a taxa de senescência de CPHs.

REFERÊNCIAS

- 1 Simpson M.A., Hsu R., Keir L.S., et al. Mutations in FAM20C Are Associated with Lethal Osteosclerotic Bone Dysplasia

- (Raine Syndrome), Highlighting a Crucial Molecule in Bone Development. *Am J Hum Genet* 2007;81(5):906–12. Doi: 10.1086/522240.
- 2 Faundes Víctor, Castillo-taucher Silvia, Gonzalez-hormazabal Patricio, Chandler Kate, Crosby Andrew, Chioza Barry. Raine syndrome : An overview. *Eur J Med Genet* 2014;57(9):536–42. Doi: 10.1016/j.ejmg.2014.07.001.
 - 3 Raine J, Winter RM, Davey A Tucker SM. Unknown syndrome: microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. *J Med Genet* 1989;26:786–8.
 - 4 Seidahmed Mohammed Zain, Alazami Anas M, Abdelbasit Omer Bashir, et al. Report of a case of Raine syndrome and literature review. *Am J Med Genet Part A* 2015;167(10):2394–8. Doi: 10.1002/ajmg.a.37159.
 - 5 Hülkamp Georg, Wieczorek Dagmar, Rieder Harald, et al. Raine syndrome: Report of a family with three affected sibs and further delineation of the syndrome. *Clin Dysmorphol* 2003;12(3):153–60. Doi: 10.1097/01.mcd.0000080413.95344.60.
 - 6 Simpson M. A., Scheuerle A., Hurst J., Patton M. A., Stewart C., Crosby Andrew H. Mutations in FAM20C also identified in non-lethal osteosclerotic bone dysplasia. *Clin Genet* 2009;75(3):271–6. Doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01118.x.
 - 7 Fradin M., Stoetzel C., Muller J., et al. Osteosclerotic bone dysplasia in siblings with a Fam20C mutation. *Clin Genet* 2011;80(2):177–83. Doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01516.x.
 - 8 Rafaelsen Silje Hjorth, Ræder Helge, Fagerheim Anne

- Kristine, et al. Exome sequencing reveals FAM20c mutations associated with fibroblast growth factor 23-related hypophosphatemia, dental anomalies, and ectopic calcification. *J Bone Miner Res* 2013;28(6):1378–85. Doi: 10.1002/jbmr.1850.
- 9 Acevedo Ana Carolina, Poulter James A., Alves Priscila Gomes, et al. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC Med Genet* 2015;16(1):1–11. Doi: 10.1186/s12881-015-0154-5.
 - 10 Takeyari Shinji, Yamamoto Takehisa, Kinoshita Yuka, et al. Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of raine syndrome. *Bone* 2014;67:56–62. Doi: 10.1016/j.bone.2014.06.026.
 - 11 Elalaoui Siham Chafai, Al-Sheqaih Nada, Ratbi Ilham, et al. Non lethal Raine syndrome and differential diagnosis. *Eur J Med Genet* 2016;59(11):577–83. Doi: 10.1016/j.ejmg.2016.09.018.
 - 12 Tamai Kei, Tada Katsuhiko, Takeuchi Akihito, et al. Fetal ultrasonographic findings including cerebral hyperechogenicity in a patient with non-lethal form of Raine syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2018;176(3):682–6. Doi: 10.1002/ajmg.a.38598.
 - 13 Rolvien T, Kornak U, Schinke T, Amling M, Oheim R. A novel FAM20C mutation causing hypophosphatemic osteomalacia with osteosclerosis (mild Raine syndrome) in an elderly man with spontaneous osteonecrosis of the knee. *Osteoporos Int* 2019;30(3):685–9. Doi: 10.1007/s00198-018-4667-6.
 - 14 Sheth Jayesh, Bhavsar Riddhi, Gandhi Ajit, Sheth Frenny,

- Pancholi Dhairya. A case of Raine syndrome presenting with facial dysmorphism and review of literature. *BMC Med Genet* 2018;19(1):85–91. Doi: 10.1186/s12881-018-0593-x.
- 15 Kingston H. M., Freeman J. S., Hall C M. A new lethal sclerosing bone dysplasia. *Skeletal Radiol* 1991;20(2):117–9. Doi: 10.1007/BF00193823.
 - 16 Kan A E, Kozlowski K. New distinct lethal osteosclerotic bone dysplasia (Raine syndrome). *Am J Med Genet* 1992;43(5):860–4. Doi: 10.1002/ajmg.1320430522.
 - 17 Patel P. J., Kolawole T. M., Al-Mofada S., Malabarey T. M., Hulailah A. Osteopetrosis: Brain ultrasound and computed tomography findings. *Eur J Pediatr* 1992;151(11):827–8. Doi: 10.1007/BF01957934.
 - 18 Al Mane Khaled, Al-Dayel Fouad, McDonald Peter. Intracranial calcification in Raine syndrome. *Pediatr Radiol* 1996;26(1):55–8. Doi: 10.4103/JPN.JPN_114_17.
 - 19 Rejjal A. Raine Syndrome. *Journal, Am Genet Med* 1998;82(December 1997):81–2.
 - 20 Al Mane Khaled, Al-Dayel Fouad, McDonald Peter. Intracranial calcification in Raine syndrome: Radiological pathological correlation. *Pediatr Radiol* 1998;28(11):820–3. Doi: 10.1007/s002470050473.
 - 21 Shalev Stavit A., Shalev Eliezer, Reich Dan, Borochowitz Zvi U. Osteosclerosis, hypoplastic nose, and proptosis (Raine syndrome): Further delineation. *Am J Med Genet* 1999;86(3):274–7. Doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19990917)86:3<274::AID-AJMG15>3.0.CO;2-R.
 - 22 Acosta A. X., Peres L. C., Chimelli L. C., Pina-Neto João M.

- Raine dysplasia: A Brazilian case with a mild radiological involvement. *Clin Dysmorphol* 2000;9(2):99–101. Doi: 10.1097/00019605-200009020-00004.
- 23 Mahafza Tareq, El-Shanti H, Omari Hamzi. Raine syndrome: report of a case with hand and foot anomalies. *Clin Dysmorphol* 2001;10(3):227–9.
- 24 Al-Gazali L. I., Hertecant J., Ahmed R., Khan N. A., Padmanabhan R. Further delineation of Raine syndrome. *Clin Dysmorphol* 2002;12(4):89–93. Doi: 10.1097/01.mcd.0000050745.67514.24.
- 25 Chitayat David, Shannon Patrick, Keating Sarah, et al. Raine syndrome: A rare lethal osteosclerotic bone dysplasia. Prenatal diagnosis, autopsy, and neuropathological findings. *Am. J. Med. Genet. Part A*, vol. 143. 2007. p. 3280–5.
- 26 Kochar Gurpreet Singh, Choudhary Anita, Gadodia Ankur, et al. Raine syndrome: a clinical, radiographic and genetic investigation of a case from the Indian subcontinent. *Clin Dysmorphol* 2010;19(3):153–6. Doi: 10.1097/mcd.0b013e32833a22c5.
- 27 Koob Mériam, Doray Bérénice, Fradin Mélanie, Astruc Dominique, Dietemann Jean Louis. Raine syndrome: Expanding the radiological spectrum. *Pediatr Radiol* 2011;41(3):389–93. Doi: 10.1007/s00247-010-1875-4.
- 28 Whyte Michael P, McAlister William H., Fallon Michael D, et al. Raine Syndrome (OMIM #259775), Caused By FAM20C Mutation, Is Congenital Sclerosing Osteomalacia With Cerebral Calcification (OMIM 259660). *J Bone Miner Res* 2017;32(4):757–69. Doi: 10.1002/jbmr.3034.

- 29 Ababneh Farouq K., Alswaid Abdulrahman, Youssef Talaat, Al Azzawi Manaf, Crosby Andrew, Albalwi Mohammed A. Hereditary deletion of the entire FAM20C gene in a patient with Raine syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2013;161(12):3155–60. Doi: 10.1002/ajmg.a.36160.
- 30 Vishwanath V, Srinivasa K, Veera Shankar M. Raine syndrome. *Indian J Hum Genet* 2014;20(1):72–5. Doi: 10.1177/8756479311409938.
- 31 Mahmood Nasim, Donne Adam, Weber Astrid, Dharmraj Poonam. Raine syndrome: a review and a report of metabolic bone disease as a new link. *Research* 2014;1:1–10. Doi: 10.13070/rs.en.1.890.
- 32 Tagliabracci Vincent S., Engel James L., Wen Jianzhong, et al. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science* (80-) 2012;336(6085):1150–3. Doi: 10.1126/science.1217817.
- 33 Kinoshita Yuka, Hori Michiko, Taguchi Manabu, Fukumoto Seiji. Functional analysis of mutant FAM20C in Raine syndrome with FGF23-related hypophosphatemia. *Bone* 2014;67:145–51. Doi: 10.1016/j.bone.2014.07.009.
- 34 Shimada Takashi, Mizutani Satoru, Muto Takanori, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(11):6500–5. Doi: 10.1073/pnas.101545198.
- 35 Cantarutti Ana Luíza Laguardia. Caracterização de cultura primária de células pulpares de paciente com mutação no gene 2016.
- 36 Dierick J. F., Eliaers François, Remacle José, et al. Stress-

- induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol* 2002;64(5–6):1011–7. Doi: 10.1016/S0006-2952(02)01171-1.
- 37 Campisi Judith. Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol cell Biol* 2007;8(september):729–40. Doi: 10.1038/nrm2233.
- 38 Cascales Helena Silva, Müllers Erik, Lindqvist Arne. How the cell cycle enforces senescence. *Aging (Albany NY)* 2017;9(10):2022–3. Doi: 10.18632/aging.101316.
- 39 Dimri Goberdhan P, Lee X, Basile George, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9363–7. Doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
- 40 Vasconcelos Rodrigo Gadelha, Ribeiro Rodrigo Alves, Vasconcelos Marcelo Gadelha, Lima Kenio Costa, Barboza Carlos Augusto Galvão. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank* 2012;13(3):461–9. Doi: 10.1007/s10561-011-9271-3.
- 41 Yokoyama Wayne M., Thompson Maria L., Ehrhardt Rolf O. Cryopreservation and thawing of cells. *Curr Protoc Immunol* 2012;(SUPPL.99):1–5. Doi: 10.1002/0471142735.ima03gs99.
- 42 Chatterjee A., Saha D., Niemann H., Gryshkov O., Glasmacher B., Hofmann N. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology* 2017;74:1–7. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.12.002.
- 43 Pegg D. E. *The History and Principles of Cryopreservation.*

- Semin Reprod Med 2002;20(1):005–14. Doi: 10.1055/s-2002-23515.
- 44 Fuller Barry J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-Letters* 2004;25(6):375–88.
- 45 Jang Tae Hoon, Park Sung Choel, Yang Ji Hyun, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 2017;6(1):12–8. Doi: 10.1016/j.imr.2016.12.001.
- 46 Kumar Ajay, Bhattacharyya Shalmoli, Rattan Vidya. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank* 2015;16(4):513–22. Doi: 10.1007/s10561-015-9498-5.
- 47 Honda Shigeru, Weigel Andrea, Hjelmeland Leonard M, Handa James T. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(2):493–8. Doi: 10.1006/bbrc.2001.4585.
- 48 V Roth. *Doubling Time Computing* 2006.
- 49 Wang Xiaowei, Seed Brian. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31(24):e154. Doi: 10.1093/nar/gng154.
- 50 Livak Kenneth J, Schmittgen Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25(4):402–8. Doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- 51 Yuan Joshua S, Reed Ann, Chen Feng, Stewart C. Neal. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:1–12. Doi: 10.1186/1471-2105-7-85.

- 52 Falk Martin, Falková Iva, Kopečná Olga, et al. Chromatin architecture changes and DNA replication fork collapse are critical features in cryopreserved cells that are differentially controlled by cryoprotectants. *Sci Rep* 2018;8(1):1–18. Doi: 10.1038/s41598-018-32939-5.
- 53 Parrinello Simona, Samper Enrique, Krtolica Ana, Goldstein Joshua, Melov Simon, Campisi Judith. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003;5(8):741–7. Doi: 10.1038/ncb1024.
- 54 Huang George T.J., Sonoyama Wataru, Chen James, Park Sang Hyuk. In vitro characterization of human dental pulp cells: Various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006;324(2):225–36. Doi: 10.1007/s00441-005-0117-9.
- 55 Nancy Priya, Shilpita Sarcar Anish Sen Majumdar and Swathi SundarRaj. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;8(9)(August):706–16. Doi: 10.1002/term.1569.
- 56 Vitro In, Dev Cell, Kim Dong K. Statistical methods for estimating doubling time in in vitro cell growth 1997;(April):289–93.
- 57 Suchánek Jakub, Soukup Tomáš, Ivančaková Romana, et al. ORIGINAL ARTICLE HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS – ISOLATION AND LONG TERM. *Acta Medica Cordoba* 2007;50(3):195–201. Doi: 10.14712/18059694.2017.82.
- 58 Itahana Koji, Campisi Judith, Dimri Goberdhan P. Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence. 2007. p. 21–31.

59 Itahana Koji, Itahana Yoko, Dimri Goberdhan P. *Cell Senescence*. vol. 965. 2013.

ANEXOS

ANEXO I NORMAS DA REVISTA

The Journal of Endodontics is owned by the American Association of Endodontists. Submitted manuscripts must pertain to endodontics and may be original research (eg, clinical trails, basic science related to the biological aspects of endodontics, basic science related to endodontic techniques, case reports, or review articles related to the scientific or applied aspects of endodontics). Clinical studies using CONSORT methods (<http://www.consort-statement.org/consort-statement/>) or systematic reviews using meta-analyses are particularly encouraged. Authors of potential review articles are encouraged to first contact the Editor during their preliminary development via e-mail at JEndodontics@UTHSCSA.edu. Manuscripts submitted for publication must be submitted solely to JOE. They must not be submitted for consideration elsewhere or be published elsewhere.

1. General Points on Composition

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (eg, spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery because their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all

manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision or that have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the Journal of Endodontics:

a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c,” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al, reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al, 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

c. Sentences are stronger when written in the active voice, that is, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally

more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus, or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

h. Authors should be aware that the JOE uses iThenticate, plagiarism detection software, to ensure originality and integrity of material published in the journal. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by the new manuscript author's own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

2. Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

3. Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

4. Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Abstract Headings Introduction, Methods, Results, Conclusions

5. Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

6. Original Research Article Guidelines

Title Page

The title describes the major emphasis of the paper. It must be as short as possible without loss of clarity. Avoid abbreviations in the title because this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (eg, use sodium hypochlorite rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). Include the manuscript title; the names and

affiliations of all authors; and the name, affiliation, and full mailing address (including e-mail) of the corresponding author. This author will be responsible for proofreading page proofs and ordering reprints when applicable. Also highlight the contribution of each author in the cover letter.

Abstract

The Abstract concisely describes the purpose of the study in 250 or fewer words. It must be organized into sections: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The hypothesis is described in the Abstract Introduction. The Abstract describes the new contributions made by this study. The Abstract word limitation and its wide distribution (eg, PubMed) make it challenging to write clearly. This section is written last by many authors. Write the abstract in past tense because the study has been completed. Provide 3-5 keywords.

Introduction

The introduction briefly reviews the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. Clearly describe the purpose of the study, the tested hypothesis, and its scope. Many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals; therefore, do not perform extensive literature review or discuss the results of the study in this section.

Materials and Methods

The Materials and Methods section is intended to permit other investigators to repeat your experiments. There are 4 components to this section: (1) detailed description of the materials used and their components, (2) experimental design, (3) procedures employed, and (4) statistical tests used to analyze the results. Most manuscripts should cite prior studies that used similar methods

and succinctly describe the essential aspects used in the present study. A "methods figure" will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then you must carefully describe the method and include validation experiments. If the study used a commercial product, the manuscript must either state that you followed manufacturer's protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an in vitro model to simulate a clinical outcome, describe either experiments made to validate the model or previous literature that proved the clinical relevance of the model. The statistical analysis section must describe which tests were used to analyze which dependent measures; P values must be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, dropouts from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

Results

Only experimental results are appropriate in this section; do not include methods, discussion, or conclusions. Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables must be cited in the text in numerical order and include a brief description of the major findings. Consider using Supplemental Figures, Tables, or Video clips that will be published online. Supplemental material often is used to provide additional information or control experiments that support the results section (eg, microarray data).

Figures

There are 2 general types of figures: type 1 includes photographs, radiographs, or micrographs; type 2 includes graphs. Type 1: Include only essential figures and use composite figures containing

several panels of photographs, if possible. Each panel must be clearly identified with a letter (eg, A, B, C), and the parts must be defined in the figure legend. A figure that contains many panels counts as 1 figure. Type 2: Graphs (ie, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). One example is a graph depicting pain scores over time. Use graphs when the overall trend of the results is more important than the exact numeric values of the results. A graph is a convenient way to report that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo-treated group over the first 24 hours, but pain reported was the same for both groups over the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups. **Tables**

Tables are appropriate when it is critical to present exact numeric values; however, not all results need be placed in either a table or figure. Instead of a simple table, the results could state that there was no inhibition of growth from 0.001%-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03%-3% NaOCl (N=5/group). If the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure.

Acknowledgments

All authors must affirm that they have no financial affiliation (eg, employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements, or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past 3 years. Disclose any potential conflict of interest. Append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Disclose all sources and attribute all grants,

contracts, or donations that funded the study. Specific wording: "The authors deny any conflicts of interest related to this study."

References

The reference style can be learned from reading past issues of JOE. References are numbered in order of citation. Place text citation of the reference Arabic number in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

7. Other Article Types and Guidelines

Manuscripts submitted to JOE that are not Original Articles must fall into one of the following categories. Abstract limit: 250 words. Note that word limits, listed by type, do not include figure legends or References. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories listed or if you would like to request pre-approval to submit additional figures, contact the Editor at JEndodontics@uthscsa.edu.

CONSORT Randomized Clinical Trial

Must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials—CONSORT—minimum guidelines for publication of randomized clinical trials (<http://www.consort-statement.org>). Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Review Article

Either narrative articles or systemic reviews/meta-analyses. Case Report/Clinical Techniques articles, even when they include an extensive review of the literature, are categorized as Case Report/Clinical Techniques. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Clinical Research

Prospective or retrospective studies of patients or patient records, research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Biology

Animal or culture studies of biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation, or pathology. Primary focus is on biology. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Technology

Focus primarily on research related to techniques and materials used, or on potential clinical use, in endodontics. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 3. Maximum number of tables: 3.

Case Report/Clinical Techniques

Reports of an unusual clinical case or use of a cutting edge technology in a clinical case. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native

document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the

illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not allowed in the reference list, but they may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo

R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web References

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references are included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style

Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-endodontics>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by Arabic numerals in parentheses, numbered in the order in which they appear in the text. *List:* Number the references in the list in the order in which they appear in the text. List 3 authors then et al.

Examples:

Journal article:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun*. 2010;163:51–59.

Book:

2. Strunk W Jr, White EB. *The Elements of Style*, 4th ed. New York: Longman; 2000.

Chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of

your article. In: Jones BS, Smith RZ, eds. *Introduction to the Electronic Age*. New York: E-Publishing; 2009:281–304.

Journal abbreviations source

Journal names are abbreviated according to Index medicus.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

ANEXO II

PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP/FM

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 Acevedo 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 sobrevivência 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: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 967.387

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: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 967.387

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 explicitada 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 Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

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

ANEXO III**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

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.

Rubrica do participante:_____ Rubrica do pesquisador:_____

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.

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.

Rubrica do participante:_____ Rubrica do pesquisador:_____

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 (61) 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 _____.