

AUGUSTO PEREIRA RESENDE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA E SENESCÊNCIA EM
CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE RAINE**

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AUGUSTO PEREIRA RESENDE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA E SENESCÊNCIA EM
CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE RAINE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

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

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

BRASÍLIA

2018

AUGUSTO PEREIRA RESENDE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA E SENESCÊNCIA EM
CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES DE PACIENTES COM
SÍNDROME DE RAINE**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 13 de dezembro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe – (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira – (Examinador)
Universidade de Brasília

Dra. Sílvia Taveira Elias – (Examinadora)
Universidade de Brasília

Dra. Bruna Rabelo Amorim – (Suplente)
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua graça e presença na minha vida, sempre me guiando aos melhores caminhos.

Aos meus pais, **Edmilson e Jussara**, que tanto se esforçaram para proporcionar a educação e conhecimento que hoje usufruo. Sem sombra de dúvidas, tudo que consegui até o momento deve-se a eles. Obrigado por sempre me apoiarem e me proporcionarem o melhor, não poderia ter pais melhores!

À minha irmã **Clarice**, por aguentar esse irmão irritante, proporcionar uma companhia agradável e alegrar meu dia com as suas histórias engraçadas do trabalho. Seu bom humor contagia e, com certeza, deixa os dias difíceis mais leves.

Ao meu amor, **Lilian**, por sempre se importar, apoiar e acreditar no meu potencial. Saiba que prezo muito pela sua companhia e ter você ao meu lado foi a melhor coisa que ocorreu na minha vida! Obrigado por ser sempre compassiva e inspiradora. Sem você esse trabalho não seria o mesmo!

À **professora Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe** por ter me acolhido no laboratório e ter oferecido, desde a graduação, a oportunidade do ingresso ao meio científico. Seu conhecimento é grandioso e a admiro muito como profissional! Com absoluta convicção, todos os seus ensinamentos me ajudaram a ser um melhor pesquisador e quero levá-los adiante. Obrigado por exercer de forma tão sublime a docência, você é uma professora que faz a diferença, pois além de ensinar, é capaz de instigar todos os alunos a atender padrões de alta qualidade acadêmica, sempre acreditando no potencial dos mesmos em elaborar trabalhos de qualidade, objetivos e com impacto científico.

À **professora Dra. Caroline Lourenço de Lima**, pelo exemplo de grande profissional e pesquisadora. Agradeço por todo o conhecimento transmitido e pela sua orientação imprescindível, sendo que sem a sua ajuda, esse trabalho seria

impossível de ser realizado. Obrigado por toda a dedicação e paciência. Sabia que você é exemplo de profissional e pesquisador para mim!

Ao **professor Me. Cláudio Rodrigues Rezende Costa** por ter ajudado imensamente na realização desse trabalho. Obrigado por toda boa vontade e solicitude, além da parceria na realização dos trabalhos acadêmicos, espero de coração conseguir retribuir da mesma maneira.

À **professora Dra. Eliete Neves Silva Guerra** por sempre estar disposta a ajudar e por ter participado da minha formação, tanto na graduação quanto no mestrado. Obrigado por compartilhar seu conhecimento, que com toda certeza foi essencial.

À graduanda **Leticia Odaguri Watanabe** por toda competência e esmero. Obrigado por ajudar na realização do presente trabalho, pois, sem sua ajuda, não seria possível concluir os ensaios propostos. Você tem um enorme potencial e um grande futuro pela frente! Tenho muita alegria em ter você como colega de trabalho!

À **Cinthia Gabriel Meireles**, por sempre me amparar nas situações difíceis, ajudando, seja na falta de materiais e reagentes, seja na opinião técnico-científica a respeito de ensaios e protocolos. Obrigado por sempre estar de braços abertos para o Laboratório de Histopatologia Bucal e todos os seus integrantes.

Ao **Dr. Paulo Yamaguti**, por transmitir o conhecimento clínico referente ao tratamento de pacientes com anomalias.

Ao **Dr. Gabriel Álvares Borges**, pela ajuda técnico-científica e metodológica.

À **Ana Gabriela Costa Normando** e **Andréia Maria Rocha Moreira**, pela companhia no Laboratório de Histopatologia Bucal e pela boa vontade em ajudar. Obrigado pela solicitude e disposição.

À **Alba Bolanos** e ao **Dominique Hotton**, pesquisadores parceiros do programa Capes/Cofecub. Obrigado pela disposição e boa vontade em vir ao Brasil ajudar toda a equipe do Laboratório de Histopatologia Bucal.

Ao **Laboratório de Farmacologia Molecular (Farmol)** e sua equipe, que mediante solicitação, prontamente me recebeu, cedeu o uso de suas facilidades e me ajudou. Sou muito grato a todos do laboratório.

À banca, em especial aos membros **professor Dr. Diêgo Madureira de Oliveira, Dra. Sílvia Taveira Elias e Dra. Bruna Rabelo Amorim** por prontamente aceitarem o convite de compô-la. Sou muito grato pela disposição dos mesmos em contribuir com esse trabalho.

À **Lídia Rosa**, pelos serviços prestados à equipe do Laboratório de Histopatologia Bucal.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro.

À **todas as outras pessoas que**, mesmo não citadas aqui, **contribuíram diretamente ou indiretamente** para a realização desse trabalho.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”
(John F. Kennedy)*

RESUMO

A síndrome de Raine (RNS; OMIM #611061) é uma doença genética rara autossômica recessiva caracterizada pela presença de osteoesclerose e anomalias craniofaciais. Atualmente, sabe-se que existem dois fenótipos ligados a essa síndrome, um letal e outro não. Em relação aos casos não letais da RNS, foram descritas várias manifestações orodentárias. A RNS é causada por mutações recessivas no gene *FAM20C*, que codifica uma quinase envolvida em diferentes processos biológicos. Cantarutti, em 2016, realizou a caracterização *in vitro* de células pulpares de indivíduos com RNS não letal, sugerindo fenótipo ligado à senescência. Estudos têm sugerido que as condições de cultura e de criopreservação podem levar à senescência celular. O objetivo do trabalho foi, primeiramente, avaliar o efeito do congelamento a -80°C sobre a capacidade proliferativa e senescência de culturas primárias de células pulpares humanas de indivíduos saudáveis (controle) e com RNS não letal e, posteriormente, comparar essas mesmas propriedades entre as culturas controle e RNS congeladas. Para isso, foram cultivadas, durante as passagens 3 a 7 (p3-7), células de culturas pulpares controle (C1 a C5) e RNS (RNS1 e RNS2) frescas e congeladas (< ou > 1 ano) para realização do ensaio de tempo de dobra populacional (*doubling time*, DT; p3-7), ensaio colorimétrico da atividade da beta-galactosidase (p3, 5 e 7) e ensaio de expressão gênica (p5; genes *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6*). Em relação ao efeito do congelamento a -80°C , os resultados mostraram que os valores de DT foram similares entre as culturas frescas e congeladas para maioria das culturas, exceto para as culturas controle C1 e C2, que apresentaram DT variável ao longo das passagens, nas culturas frescas e congeladas (< 1 ano), e para a cultura RNS1 na p7, na qual foi observado um maior DT para o grupo de células frescas em relação às congeladas (> 1 ano). A porcentagem de células coradas pelo ensaio da atividade da beta-galactosidase não variou entre os grupos fresco e congelado para todas as populações estudadas, exceto para cultura RNS1 na p5, na qual se observou menor porcentagem de células coradas na população congelada (> 1 ano) em relação a fresca. A expressão dos genes *P21* (*CDKN1A*), *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* foi semelhante entre as populações frescas e congeladas. Em relação à comparação das culturas congeladas (> 1 ano) de RNS com as de indivíduos saudáveis (controles), os valores de DT foram similares. A porcentagem de células coradas foi mais elevada

nas culturas RNS1 e RNS2 na p7 e 5, respectivamente, em relação ao controle. A expressão de *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* na p5, comparada ao controle, foi maior na cultura RNS2 e de *IL6* foi menor na cultura RNS1. Logo, o congelamento a -80°C por aproximadamente um ano e meio parece não afetar a capacidade proliferativa e senescência de células de indivíduos saudáveis e com RNS, porém, em relação ao controle, a cultura RNS2 estudada parece apresentar alterações no processo de senescência celular.

Palavras-chave: Criopreservação; proliferação celular; polpa dentária; senescência; síndrome de Raine.

ABSTRACT:

Raine syndrome (RNS; OMIM #611061) is a rare autosomal recessive genetic disorder characterized by the presence of osteosclerosis and craniofacial anomalies. Currently, it is known that there are two phenotypes linked to this syndrome, which one is lethal and the other is not. The RNS is caused by recessive mutations in FAM20C gene, that codifies a kinase involved in many biological processes. Cantarutti, in 2016, characterized *in vitro* dental pulp cells from one person with non-lethal RNS and suggested that these cells were senescent. Studies have suggested that culture conditions and cryopreservation may lead to senescence. Thus, the aim of this study was, first, evaluate the effect of freezing at -80°C on the proliferative capacity and senescence of primary human dental pulp cells culture of healthy persons and of patients with non-lethal RNS. Secondly, the objective was to compare these same biological properties between frozen control and RNS cultures. For that, it was established and cultured fresh and frozen (< or > 1 year) cells of healthy pulp cultures (control; C1 to C5) and RNS pulp cultures (RNS1 and RNS2) from passages 3 to 7 (p3-7) and it was executed a doubling time assay (p3-7; DT), a colorimetric assay of beta-galactosidase activity (p3, 5 e 7) and a gene expression essay (p5; genes *P21*, *CYCLIN D1*, *IL1B* e *IL6*). About the effect of freezing at -80°C, the results showed that DT values were similar between fresh and frozen cultures for most of the studied cultures, with exception of the control cultures C1 and C4, that showed variable DT values in their frozen (< 1 year) and fresh cultures along all passages studied, and of the culture RNS1 at p7, that it was observed higher DT values for the fresh culture in comparison to the frozen (> 1 year) ones. The percentage of stained cells by the colorimetric assay of the beta-galactosidase activity did not varied between the fresh and frozen groups for all populations studied, with exception of the culture RNS at p5, that it was observed less percentage of stained cells in the frozen (> 1 year) population in comparison to the fresh ones. The expression at p5 of the *P21* (*CDKN1A*), *CYCLIN D1*, *IL1B* and *IL6* genes was similar between fresh and cryopreserved populations. Related to the comparison of frozen (> 1 year) RNS and control cultures, the values of DT were similar. The percentage of stained cells, in comparison to the control, was higher on the RNS1 and RNS2 cultures at p7 and p5, respectively. The expression at p5 of *P21* (*CDKN1A*), *CYCLIN D1*, *IL1B*, in comparison to the control, were higher in

the RNS2 culture and the expression of *IL6* was lower in the RNS1 culture. Concluding, the freezing at -80°C for approximately one and half year seems to not affect the proliferative capacity and senescence of healthy and RNS cells; however, related to the control, the RNS2 cells studied seem to have alterations on the senescence process.

Keywords: Cryopreservation; cell proliferation; dental pulp; senescence; Raine syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas do dente e do periodonto de sustentação.....	21
Figura 2 - Representação esquemática do estabelecimento de culturas primárias pela técnica de explante	36
Figura 3 - Representação esquemática do desenho experimental do presente estudo	38
Figura 4 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (3, 4, 5, 6 e 7) das culturas primárias controle frescas e congeladas por menos de 1 ano (C1, C2, C3 e C4).....	44
Figura 5 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (3, 4, 5, 6 e 7) da cultura primária controle C2 fresca e congelada por mais de 1 ano	45
Figura 6 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (3, 4, 5, 6 e 7) da cultura primária RNS1 fresca e congelada por mais de 1 ano	46
Figura 7 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase de 4 culturas primárias controle frescas e congeladas por menos de um ano (C1, C2, C3 e C4)	47
Figura 8 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase em culturas primárias controle frescas (C1, C2, C3 e C4) e congelada (C2) por mais de um ano.....	48
Figura 9 - Microfotografias representativas, obtidas após ensaio de atividade da beta-galactosidase nas culturas primárias frescas (A, C e E) e congeladas (B, D e F) por mais de um ano do controle C2.....	49
Figura 10 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase em cultura primária RNS1 fresca e congelada por mais de um ano	50
Figura 11 - Microfotografias representativas, obtidas após ensaio de atividade da beta-galactosidase nas culturas primárias frescas (A, C e E) e congeladas (B, D e F) por mais de um ano da RNS1.....	51

Figura 12 - Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes <i>P21</i> , <i>CICLINA D1</i> , <i>IL1B</i> e <i>IL6</i> obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado nas culturas controle frescas e congeladas por menos de um ano (C1, C2, C3 e C4)	52
Figura 13 - Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes <i>P21</i> , <i>CICLINA D1</i> , <i>IL1B</i> e <i>IL6</i> obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado nas culturas controle frescas C1, C2, C3 e C4 e na cultura controle C2 congelada por mais de um ano	53
Figura 14 - Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes <i>P21</i> , <i>CICLINA D1</i> , <i>IL1B</i> e <i>IL6</i> obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado na cultura RNS1 fresca e congelada por mais de um ano.....	54
Figura 15 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (passagens 3, 4, 5, 6 e 7) das culturas controle (C2 e C5) e RNS (RNS1 e RNS2).....	55
Figura 16 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase em culturas controle (C2 na passagem 3 ou C2 e C5 em conjunto nas passagens 5 e 7) e RNS (RNS1 e RNS2), nas passagens 3, 5 e 7	56
Figura 17 - Microfotografias representativas, obtidas após ensaio de atividade da beta-galactosidase das culturas primárias controle C2 (A e B) e C5 (C e D) e das culturas primárias RNS1 (E e F) e RNS2 (G e H)	57
Figura 18 - Representação gráfica da expressão relativa, na quinta passagem, dos genes <i>P21</i> , <i>CICLINA D1</i> , <i>IL1B</i> e <i>IL6</i> obtida por meio de ensaio RT-qPCR realizado nas culturas primárias controle (C2 e C5), e RNS (RNS1 e RNS2)	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutações no gene FAM20C descritas na literatura referentes à RNS	25
Tabela 2 - Informações sobre os pacientes com RNS.....	34
Tabela 3 - informações sobre o tempo de congelamento de cada cultura	37
Tabela 4 - Relação de primers utilizados na PCRq	42
Tabela 5 - Tempo de dobra populacional (<i>doubling time</i> , DT), em dias, das culturas controle fresca e congelada (por menos de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).....	43
Tabela 6 - Tempo de dobra populacional (<i>doubling time</i> , DT), em dias, da cultura controle C2 fresca e congelada (por mais de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).....	45
Tabela 7 - Tempo de dobra populacional (<i>doubling time</i> , DT), em dias, da cultura RNS1 fresca e congelada (por mais de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).....	46
Tabela 8 - Tempo de dobra populacional (<i>doubling time</i> , DT), em dias, das culturas controle e RNS frescas e congeladas (por mais de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7)	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	beta actina
AS- β -Gal	beta galactosidase associada à senescência
CDKIs	quinases dependentes de ciclina
cDNA	DNA complementar
CT	<i>cycle threshold</i>
DDR	resposta ao dano no DNA
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMP1	proteína da matriz dentinária 1
DMSO	dimetilsulfóxido
DT	tempo de dobra populacional
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAM20	<i>family with sequence similarity 20</i>
FGF23	fator de crescimento de fibroblastos 23
FS	Faculdade de Ciências da Saúde
IL1A	interleucina 1 alfa
IL1B	interleucina 1 beta
IL6	interleucina 6
NaPi-IIa	cotransportador de sódio-fosfato 2a
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFKB1	fator nuclear kappa B
OPN	osteopontina
p	passagem
P21	<i>CDKN1A</i> ; inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
P16	<i>CDKN2A</i> ; inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
PBS	solução salina tamponada com fosfato
p/v	peso por volume
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNS	síndrome de Raine
Rpm	rotações por minuto
SASP	fenótipo de secreção associada à senescência

SFB	soro fetal bovino
SIBLINGs	<i>small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein</i>
SLRPs	<i>small leucine-rich proteoglycans</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	receptor do tipo Toll like
TNF	fator de necrose tumoral alfa
TP53	proteína tumoral p53
v/v	volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. BREVE DESCRIÇÃO DO ÓRGÃO DENTÁRIO	21
2.2. COMPLEXO DENTINA POLPA.....	22
2.3. POLPA DENTÁRIA.....	22
2.4. DENTINA.....	22
2.5. SÍNDROME DE RAINE.....	24
2.6. SENESCÊNCIA.....	28
2.7. CRIOPRESERVAÇÃO.....	29
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	32
4. MÉTODOS.....	33
4.1. ASPECTOS ÉTICOS	33
4.2. PARTICIPANTES DA PESQUISA	33
4.3. DESENHO EXPERIMENTAL	34
4.4. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS.....	35
4.5. CRIOPRESERVAÇÃO.....	36
4.6. DESCONGELAMENTO	36
4.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DOBRA POPULACIONAL	37
4.8. AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA.....	38
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5. RESULTADOS	43

5.1. EFEITO DO CONGELAMENTO A -80°C SOBRE A PROLIFERAÇÃO E SENESCÊNCIA DE CÉLULAS PULPARES.....	43
5.2. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA E SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS PULPARES CONGELADAS DE PACIENTES SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM SÍNDROME DE RAINE.....	55
6. DISCUSSÃO.....	59
7. SÍNTESE DOS RESULTADOS	66
8. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	79
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP/FM – UnB (967.387/2015).....	81

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Raine (RNS; OMIM #611061), relatada inicialmente por Raine em 1989, é uma doença genética rara, autossômica recessiva e caracterizada pela presença de osteoesclerose e anomalias craniofaciais (1). Atualmente, sabe-se que existem dois fenótipos ligados a essa síndrome, um letal, caracterizado pela morte perinatal, e outro não letal, com relatos de indivíduos que alcançaram a idade adulta (2, 3). Em relação aos casos não letais da RNS, foram descritas várias manifestações orodentais como hipoplasia maxilar, palato ogival, mordida aberta, amelogênese imperfeita hipoplásica, alterações na erupção dentária, defeitos na formação e mineralização dentinária e a presença de abscessos periapicais (4-11). A presença de raquitismo hipofosfatêmico também foi relatada em casos de RNS não letal (4, 5, 8, 12).

A RNS é causada por mutações recessivas no gene *FAM20C*, localizado no cromossomo 7, na região p22.3, e codifica a quinase FAM20C, que forma um complexo responsável por fosforilar a serina de proteínas secretadas com o motivo Ser-x-Glu (13). Entre as proteínas fosforiladas pela FAM20C, estão as *small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein* (SIBLINGs), uma família de fosfoproteínas importantes para o processo de biomineralização, com papel essencial na osteogênese e dentinogênese (14-17). Em modelo de camundongo nocaute condicional, a inativação do gene *Fam20c* confirmou a presença de defeitos graves de formação e mineralização dentinária (18). Posteriormente, Tagliabratti *et al.*, em 2015, identificaram, em estudo *in vitro*, mais de 100 proteínas fosforiladas pela FAM20C, sendo proteínas envolvidas em diversos processos celulares, tais como migração, regeneração, cicatrização e resposta inflamatória (19). Cantarutti, em 2016, realizou a caracterização, *in vitro*, de células pulpares previamente congeladas de um indivíduo com RNS não letal (RNS2), que apresentava mutação em homozigose no gene *FAM20C* (c.1487C>T; p.Pro496Leu), e descreveu, nessas células, redução no potencial de mineralização, redução na capacidade migratória celular, alterações no citoesqueleto e redução na atividade metabólica mitocondrial, sugerindo fenótipo de células senescentes (20).

A senescência pode ser promovida por condições de cultura inapropriadas, tais como material da placa de cultura, tipo de meio de cultura, concentração do soro e

concentração de oxigênio (21-23). Além disso, estudos *in vitro* realizados em fibroblastos dérmicos e em linhagem de células do epitélio pigmentar da retina sugerem que as condições de criopreservação e descongelamento também são estressores celulares que podem promover a senescência (23-25).

Baseado nas evidências previamente relatadas e nos achados descritos por Cantarutti, em 2016, o objetivo do presente trabalho foi, inicialmente, avaliar o efeito do congelamento a -80°C sobre a proliferação e senescência de cultura primária de células pulpares humanas de indivíduos saudáveis e com RNS não letal e, posteriormente, comparar a capacidade proliferativa e senescência de culturas primárias de células pulpares congeladas de indivíduos saudáveis e de dois indivíduos com RNS não correlacionados, denominados, neste estudo, RNS1 (c.784+5G>C) e RNS2 (c.1487C>T; p.Pro496Leu).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BREVE DESCRIÇÃO DO ÓRGÃO DENTÁRIO

Os dentes são órgãos anatomicamente divididos pela margem cervical em coroa e raiz dentária. A coroa corresponde a porção do dente visível na cavidade bucal, enquanto a raiz consiste na porção ancorada aos processos alveolares do complexo maxilomandibular, por meio do periodonto de inserção. A coroa do dente é formada pelo esmalte, que é um tecido mineralizado de origem epitelial, e pela dentina e polpa, com origem ectomesenquimal. (26).

A dentina e a polpa, tecidos que compõem a maior parte do dente, se inter-relacionam anatômica e funcionalmente, formando o complexo dentina polpa. Na coroa dentaria, o complexo dentina polpa é recoberto pelo esmalte e, na raiz, é recoberto pelo cemento (27, 28) (Figura 1).

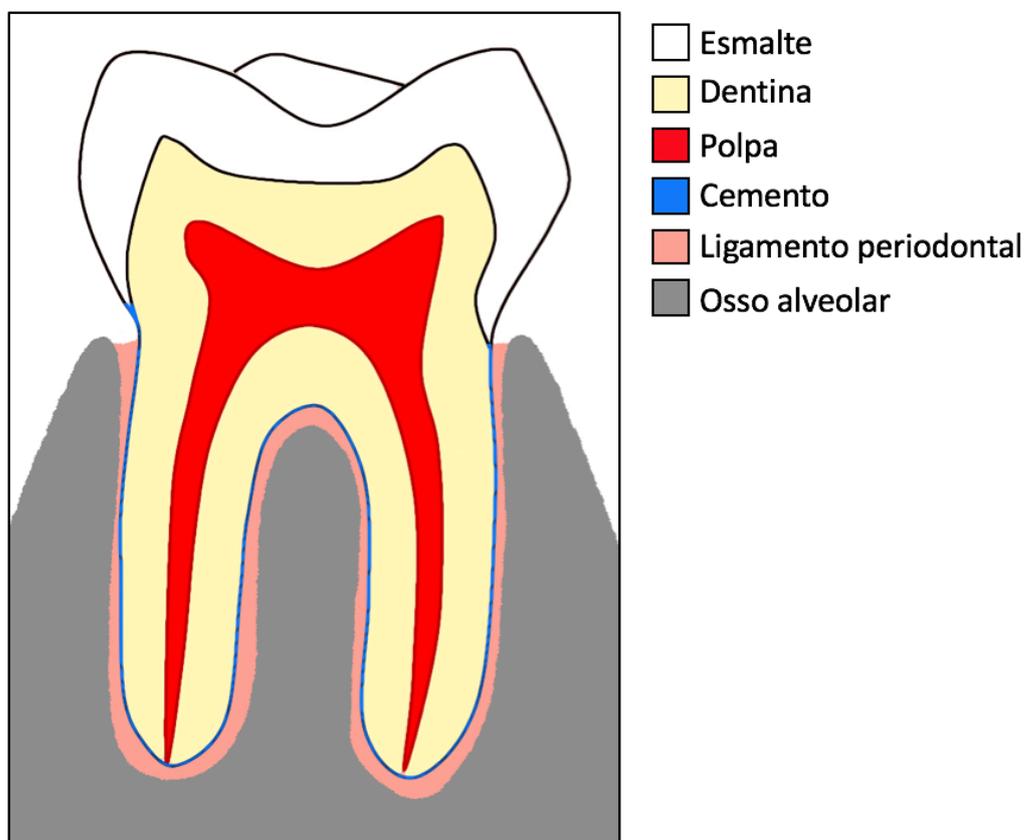


Figura 1 – Representação esquemática das estruturas do dente e do periodonto de sustentação.
Autoria própria.

2.2. COMPLEXO DENTINA POLPA

O complexo dentina polpa se desenvolve durante o processo de odontogênese, a partir da papila dentária, tecido ectomesenquimal derivado das células da crista neural craniana (29, 30). Ao contrário do esmalte dentário, o complexo dentina polpa apresenta vitalidade, respondendo a estímulos externos e possuindo capacidade de reparo, que ocorre por meio da formação de dentina terciária (31, 32).

2.3. POLPA DENTÁRIA

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo presente na região central do dente e circundada por dentina. É um tecido altamente innervado e vascularizado que abriga, em sua periferia, células pós-mitóticas especializadas na secreção e mineralização da matriz dentinária, os odontoblastos (32, 33). Além dos odontoblastos, a polpa dentária é constituída por fibroblastos, células endoteliais, células neuronais, células do sistema imunológico, pericitos e células ectomesenquimais indiferenciadas (34, 35).

2.4. DENTINA

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado, acelular e avascular formado pelos odontoblastos, células especializadas do complexo dentina polpa e que controlam a secreção e mineralização de matriz extracelular dentinária. A dentina contém em quase toda sua extensão canalículos cilíndricos, denominados túbulos dentinários. Dentro desses estão localizados os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos, que conferem ao tecido dentinário sensibilidade e capacidade de resposta frente às agressões (27, 28).

A dentina é composta por aproximadamente 10% de água, 20% de matéria orgânica, principalmente colágeno tipo I, e 70% de matéria inorgânica, na forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). Além do colágeno, a dentina apresenta outras proteínas, denominadas proteínas não-colagênicas, sendo principalmente formada por proteínas de duas famílias, as SLRPs (*Small Leucine-Rich Proteoglycans*) e as SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins*), todas importantes na regulação da biomineralização, atuando como inibidoras,

promotoras ou estabilizadoras do crescimento dos cristais de hidroxiapatita. A sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP) são as principais proteínas pertencentes à família das SIBLINGs, que participam da regulação da mineralização dentinária (16). Outras proteínas importantes desse grupo são a osteopontina (OPN), potente inibidor da mineralização, e a fosfoproteína acídica da matriz dentinária 1 (DMP1), que também participa do processo de mineralização da matriz dentinária (14, 15).

A dentina pode ser classificada em três tipos: dentina primária, secundária e terciária. A dentina primária é secretada por odontoblastos primários, durante o período de desenvolvimento do germe dentário, sendo, portanto, a primeira dentina a ser formada. A dentina secundária é a dentina secretada pelos odontoblastos após completa formação do dente, sendo depositada lentamente durante toda vida. A dentina terciária é entendida como uma resposta do organismo frente a um estímulo químico, físico ou de origem microbiana (36, 37). Ela é depositada pelos odontoblastos primários somente nas regiões que sofreram lesão ou, em caso de morte desses, sua deposição se dá por células similares a odontoblastos, que são derivadas de células-tronco/progenitoras presentes no tecido pulpar. A dentina terciária tem a finalidade de diminuir a permeabilidade dentinária ou aumentar a distância da polpa em relação ao agente agressor, protegendo, assim, a vitalidade pulpar (38).

Algumas desordens genéticas raras manifestam defeitos de formação da dentina. Esses defeitos podem ter origem em mutações de genes que codificam proteínas importantes da matriz, como o gene do colágeno, da sialoproteína ou da fosfoproteína dentinária, resultando em defeitos dentinários isolados ou associados a síndromes, tais como a osteogênese e dentinogênese imperfeita (39, 40). Outras desordens genéticas que apresentam alterações metabólicas sistêmicas, como a desregulação dos níveis de fosfato, também podem afetar o processo de biomineralização dentinária, como no caso do raquitismo hipofosfatêmico familiar (41). Recentemente, foram descritas alterações dentinárias e pulpares em duas famílias brasileiras com diagnóstico de síndrome de Raine (4).

2.5. SÍNDROME DE RAINE

A síndrome de Raine (RNS; OMIM #259775) é uma displasia esquelética neonatal rara, com modo de herança autossômico recessivo, que tem como uma das principais características a presença de osteoesclerose (1, 8). A RNS foi primeiramente descrita por Raine, em 1989, sendo um relato de caso de uma recém-nascida do sexo feminino que apresentava várias anomalias craniofaciais como microcefalia, fontanelas largas, exoftalmia proeminente, depressão da ponte nasal, atresia das coanas, hipoplasia do terço médio da face, implantação baixa das orelhas, micrognatia, lábio superior arqueado, fissura palatina e hiperplasia gengival. A paciente apresentava dificuldade respiratória logo após o nascimento que foi associada a hipoplasia pulmonar, falecendo aos 86 minutos de vida (1). Após o relato inicial de Raine, novos casos de RNS letal com alterações similares foram descritos, sendo a osteoesclerose, a exoftalmia e a hipoplasia do terço médio sempre presentes e, em todos esses casos, os neonatos acometidos morriam em questão de horas ou dias (9, 10, 42-51). Porém, em 2009, Simpson *et al.* relataram, pela primeira vez, dois casos não relacionados, de crianças de 8 e 11 anos com RNS não letal (8). Até o presente, 18 casos de pacientes que sobreviveram a infância foram descritos (2-6, 11, 52-54). Dentre esses casos de RNS não letal, também foi relatada a presença de raquitismo hipofosfatêmico (4, 5, 8, 12).

Com o surgimento dos relatos de caso de RNS não letal, foi possível identificar novas características fenotípicas até então impossíveis de serem observadas nos primeiros dias de vida, como as manifestações orodentais. A respeito dessas, foram relatados hipoplasia maxilar, palato ogival, mordida aberta, amelogênese imperfeita hipoplásica, alterações na erupção dentária, defeitos globulares na dentina, desgastes dentários excessivos, alterações na câmara pulpar e a presença de abscessos periapicais (4-11).

Em 2007, foi descrita a primeira mutação no gene *FAM20C* em paciente com RNS letal (10). Desde então, 24 outras mutações no gene *FAM20C* foram descritas na literatura, relacionadas tanto aos casos letais quanto aos não letais (2-8, 10, 11, 53-55) (Tabela 1).

Tabela 1 – Mutações no gene FAM20C descritas na literatura referentes à RNS

Relatos de caso	Classificação	Mutação
Simpson et al., 2007	Letal	c.1603C >T (p.Arg535Trp) c.915-3C>G c.1121T>G (p.Leu374Arg) 45, XY psudic (7;7) (p22;p22) c.1093G>A (p.Gly365Arg) c.1094G>A (p.Gly365Glu) c.1322-2A>G c.914+5G>C c.1404-1G>A
Simpson et al., 2009	Não letal	c.1309G>A (p.Asp437Asn) c.796G>A (p.Gly266Arg) c.796G>A (p.Gly266Arg)
Kochar et al., 2010	Letal	c.1630C>T (p.Arg544Trp)
Fradin et al., 2011	Não letal	c.940C>T (p.Pro314Ser)
Rafaelsen et al., 2013	Não letal	c.803C>T (p.Thr268Met) c.915C>A (p.Y305X)
Ababneh et al., 2013	NR	46,XY.arr [hg19] 7p22.3 (36480- 523731)
Takeyari et al., 2014	Não letal	c.1222C>T (p.Arg408Trp)
Acevedo et al., 2015	Não letal	c.784+ 5G>C* (p.Trp202Cysfs*37) c.1487C>T (p.Pro496Leu)
Elalaoui et al., 2016	NR	c.676T > A (p.Trp226Arg)
Mahmood et al., 2017	NR	c.1135G>A (p.Gly379Arg)
Sheth et al., 2018	Não letal	c.1228T>A (p.Ser410Thr)
Rolvien et al., 2018	Não letal	c.906C>A (Phe302Leu) c.952_956+ 30dup

NR, não relatado

O gene *FAM20C*, identificado em vários mamíferos, com sequências altamente conservadas evolutivamente, é formado por 10 exons e está localizado no cromossomo 7, na região p22.3. Ele codifica a proteína FAM20C que faz parte de uma família denominada *family with sequence similarity 20* (FAM20), da qual também fazem parte a FAM20A e a FAM20B. A FAM20C é uma quinase localizada no complexo de Golgi, responsável por fosforilar a serina de proteínas secretadas que apresentam o motivo Ser-x-Glu (13). Essa proteína é responsável por fosforilar as SIBLINGs, fosfoproteínas importantes na regulação do processo de biomineralização óssea e dentinária, como a OPN e a DMP1. Mutações no gene *FAM20C* podem levar a tradução de proteínas não funcionais ou com comprometimento da atividade quinase. Em relação às mutações relatadas em casos de RNS não letal, estudo *in vitro*, de duas dessas mutações, demonstrou redução da eficiência de fosforilação da OPN pela proteína FAM20C codificada (17). Assim, o comprometimento da ação quinase da FAM20C pode estar associado com os defeitos de mineralização encontrados na RNS (15, 17).

Outra proteína identificada como substrato da FAM20C é o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23). Sua fosforilação pela FAM20C resulta na inibição da glicosilação dessa proteína e consequente degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (19). O FGF23 é responsável por modular os níveis séricos de fosfato por meio da formação do complexo FGFR/FGF23/Klotho, que inibe a expressão de cotransportadores de sódio-fosfato 2a (NaPi-2a), responsáveis pela reabsorção de fosfato pelos túbulos proximais renais (56, 57). Portanto, a presença de FGF23 induz aumento da excreção renal de fosfato. Níveis aumentados de FGF23 foram relatados em indivíduos com RNS que apresentavam raquitismo hipofosfatêmico, cuja manifestação consiste na mineralização deficiente da matriz osteoide do osso cortical e trabecular em função de níveis de fosfato sérico abaixo do normal (5).

Com o objetivo de entender o papel da FAM20C nos tecidos mineralizados, Wang *et al.*, em 2012, realizaram estudo em camundongos nocaute para *FAM20C* e observaram que a inativação desse gene levava ao desenvolvimento de hipofosfatemia nesses animais, com o aumento dos níveis de FGF23, tanto séricos quanto ósseos. Eles também observaram redução da expressão de *DMP1* (18). Além disso, Tagliabracci *et al.*, em 2012, demonstraram, *in vitro*, que a FAM20C é responsável pela fosforilação de *DMP1* (17). Acredita-se que a fosforilação da *DMP1* seja determinante para a secreção dessa proteína (58). A *DMP1* parece estar

envolvida na regulação negativa da expressão de *FGF23* e síndromes que afetam a DMP1, como a hipofosfatemia autossômica recessiva, demonstraram aumento dos níveis de *FGF23* (59). Em camundongos nocaute, a inativação de *Dmp1* resultou no aumento da expressão de *Fgf23* e no desenvolvimento de hipofosfatemia (60). Porém, a participação da *Dmp1* ainda não é bem compreendida, já que estudo da expressão de *Dmp1* em camundongos nocaute para *Fam20c* demonstrou que mesmo aumentando a expressão de *Dmp1* não foi possível impedir o aparecimento de defeitos ósseos e dentinários. Isso indicaria que, provavelmente, a redução de expressão de DMP1 pode não estar diretamente associada a esses defeitos (61).

Nos dentes, estudos com camundongos nocaute para *Fam20c* demonstraram defeitos graves na dentina, esmalte e cemento. Em relação ao complexo dentina polpa, esses animais apresentavam câmaras pulpares alargadas, malformações de cúspides, raízes mal desenvolvidas, dentina hipoplásica e ausência de túbulos dentinários. Além disso, apresentavam baixa expressão de marcadores de diferenciação odontoblástica e ameloblástica (18, 62). Outro estudo com camundongos nocaute condicional para *FAM20C* em células que expressam colágeno demonstrou o desenvolvimento de doença periodontal com formação de bolsas e inflamação do ligamento periodontal (63).

Em relação aos estudos *in vitro*, Cantarutti, em 2016, estabeleceu cultura primária de células pulpares de um paciente com RNS, apresentando mutação em homozigose no exon 9 do gene *FAM20C* (c.1487C>T), correspondendo, na proteína codificada, à região de sítio catalítico (p.Pro496Leu) (20). Esse paciente pertence a uma das famílias com pais consanguíneos relatada por Acevedo *et al.*, em 2015 (4). A caracterização dessas células demonstrou redução da atividade metabólica mitocondrial, alterações no citoesqueleto, redução da capacidade migratória celular e redução no potencial de mineralização, quando comparadas com células controle de indivíduos saudáveis, sugerindo fenótipo de células senescentes (20).

2.6. SENESCÊNCIA

A senescência celular é um mecanismo potente de supressão tumoral devido a interrupção do ciclo celular. Ela impede que células que sofreram estresse ou lesões graves no DNA se repliquem. Isso evita a propagação dos danos para as células filhas, protegendo-as de uma possível transformação maligna (64). A senescência também é um processo que limita a capacidade proliferativa das células, impedindo que uma célula consiga se dividir indefinidamente. No último caso, o processo é denominado de senescência replicativa, sendo controlado pela redução gradativa dos telômeros a cada replicação, gerando, ao final do processo, uma resposta ao dano no DNA (DDR) permanente (65). Dentre os estresses que podem induzir senescência celular, pode-se citar a disfunção telomérica, a deterioração mitocondrial, o estresse oxidativo, os danos graves e irreparáveis ao DNA, a ruptura da cromatina, a expressão de oncogenes e as moléculas envolvidas no processo inflamatório (66-68).

Todas as células que apresentam capacidade de proliferar podem apresentar senescência, sendo geralmente encontradas em tecidos com alta capacidade de renovação ou que foram expostos a processos inflamatórios crônicos (69). As principais características de células senescentes são a interrupção permanente e irreversível da proliferação, o aumento do tamanho da célula, a expressão de beta galactosidase associada à senescência (AS- β -Gal) nos lisossomos e a possível presença de fenótipo específico, denominado fenótipo de secreção associada à senescência (SASP) (70).

A medida que as células entram em senescência, algumas desenvolvem um fenótipo ligado a mudanças na expressão e na secreção de proteínas, denominado SASP. Essas células são responsáveis por produzir diversas moléculas: interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteínas e componentes da matriz, muitas das quais estão associadas ao recrutamento do sistema imune (68).

Em relação à cultura de células pulpares, há poucos estudos sobre senescência. Três desses estudos, utilizando células indiferenciadas da polpa, demonstraram o desenvolvimento de senescência replicativa após o esgotamento da capacidade proliferativa, com redução do potencial de diferenciação odontoblástico (71-73). Eles também demonstraram o desenvolvimento de senescência por indução com lipopolissacarídeo bacteriano, por meio da ativação da via NF κ B, com células apresentando fibras de F-actina desordenadas e acumuladas próximas à região do

núcleo (71-73). Estudos com culturas pulpares heterogêneas demonstraram que as células senescentes apresentavam vários vacúolos autofágicos, além de diminuição da capacidade de diferenciação, tanto osteoblástica quanto odontoblástica, à medida que o processo de senescência celular evoluiu (74, 75).

A senescência, segundo a literatura, parece estar associada à criopreservação. Estudo *in vitro* identificou, em fibroblastos dérmicos, mudanças estruturais no DNA associadas à criopreservação e ao descongelamento, apresentando colapso do garfo de replicação e quebra das duas fitas de DNA (24). Outro estudo, utilizando células do epitélio pigmentar da retina, demonstrou que o processo de criopreservação e descongelamento pode induzir a senescência celular, com o aumento de quebras de uma das fitas de DNA nas regiões teloméricas, acelerando o encurtamento dos telômeros (25).

2.7. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação consiste na preservação de células ou tecidos, por tempo indefinido, em temperaturas extremamente baixas, geralmente entre -80°C ou -196°C (76, 77). Com o intuito de proteger as células dos danos causados pelo congelamento, são utilizados crioprotetores. Os crioprotetores são moléculas que aumentam a concentração de solutos na solução de congelamento, aumentando a taxa de sobrevivência celular (78). São considerados crioprotetores ideais os compostos que apresentam as seguintes características: alta solubilidade em água, capacidade de penetração nas células e baixa toxicidade que permita a sobrevivência celular em altas concentrações de crioprotetor (78). Entre os crioprotetores comumente utilizados, estão os permeáveis à membrana. Eles apresentam capacidade de entrar nas células, colaborando com a correção da osmolaridade. No grupo dos crioprotetores permeáveis à membrana, um dos principais compostos é o dimetilsulfóxido (DMSO), que se destaca pela baixo custo e relativa baixa toxicidade (79, 80).

A criopreservação está intimamente relacionada com o processo de formação do gelo. Quando uma amostra, em solução aquosa, é congelada, existe o processo de nucleação dos cristais de gelo. Os cristais vão crescendo e se expandindo em tamanho, à medida que moléculas de água vão sendo incorporadas. O gelo formado é, basicamente, composto por água pura, e os solutos, que permanecem na fase

líquida, tornam a solução aquosa cada vez mais concentrada. Logo, as células presentes dentro da solução em congelamento vão sendo expostas a um meio cada vez mais hipertônico, o que leva à um desequilíbrio osmótico entre as células e o meio externo. Para manter o equilíbrio, existe um efluxo de água por parte das células, causando desidratação à medida que o congelamento progride com possibilidade de dano celular (76, 81-83). Quando a velocidade do congelamento é lenta o suficiente para permitir o efluxo progressivo de água dentro das células, a probabilidade de formação de cristais de gelo intracelulares é reduzida. A obtenção do equilíbrio osmótico das células depende de vários fatores, como a velocidade de congelamento, a permeabilidade celular à água e a proporção superfície/volume celular (81).

Tão importante quanto o processo de congelamento é o processo de descongelamento. O comportamento dos pequenos cristais de gelo intracelular difere em casos de rápido e lento descongelamento. Quando o mesmo é lento, os cristais de gelo tendem a se recrystalizarem, juntarem e crescerem, causando danos celulares. No entanto, quando o descongelamento é rápido, não existe tempo suficiente para permitir o crescimento dos mesmos, o que leva ao derretimento desses cristais (78).

A associação entre a concentração dos crioprotetores e a velocidade de congelamento caracterizam os diferentes tipos de criopreservação. Sendo assim, existem basicamente dois principais tipos de criopreservação: A vitrificação e o congelamento lento convencional. O primeiro tipo, a vitrificação, consiste no uso de altas concentrações de crioprotetores (entre 40-60% p/v) em combinação com uma velocidade de congelamento alta, permitindo a transformação direta da água do estado líquido para o estado vítreo (84). Essa metodologia consiste no uso de temperaturas muito baixas, apresentando a vantagem de prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares, o que possibilita uma maior taxa de sobrevivência celular. No entanto, essa técnica tem um maior potencial de contaminação e é mais difícil de ser executada do que o congelamento lento convencional (80). O segundo tipo, o congelamento lento convencional, consiste no uso de pequenas concentrações de crioprotetores aliado ao congelamento em baixas velocidades. A vantagem dessa metodologia consiste na facilidade e na baixa chance de contaminação da amostra durante o processo de congelamento. Porém, existe uma grande probabilidade de danos celulares causados pela formação de gelo intracelular (80).

Para realização da criopreservação por meio do congelamento lento convencional, podem ser utilizados freezers a -80°C ou os equipamentos a base de nitrogênio líquido (-196°C), porém, recomenda-se o uso dos últimos nos casos de armazenamento prolongado das amostras, pelo fato desses dispositivos não sofrerem as variações de temperatura do freezer a -80°C , que precisa ser constantemente aberto para deposição ou retirada de amostras. Além disso, os equipamentos a base de nitrogênio líquido não dependem de energia, descartando, assim, o risco de perda das amostras em caso de instabilidade da rede elétrica (85). Porém, isso não descarta a possibilidade de uso de freezer a -80°C para armazenamento das amostras, existindo, na literatura, estudos que demonstraram sucesso em armazenar amostras por um longo período de tempo utilizando esses equipamentos (86).

Sabendo que o freezer a -80°C é uma opção viável para o congelamento de células, permitindo o estoque e armazenamento de alíquotas para estudo futuro, porém, considerando que, segundo estudos *in vitro*, o congelamento estaria relacionado a danos no DNA responsáveis pela indução do processo de senescência celular, levantou-se a hipótese de que as alterações celulares sugestivas de senescência relatadas por Cantarutti, em 2016, em cultura primária de células da polpa dentária humana, poderiam estar relacionadas à criopreservação e ao descongelamento.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a capacidade proliferativa e senescência de culturas primárias de células pulpares de indivíduos saudáveis e com RNS.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Primeiramente, avaliar o efeito do congelamento a -80°C sobre a proliferação e senescência de culturas primárias de células pulpares humanas de pacientes saudáveis e com RNS a fim de descartar a influência do mesmo sobre tais propriedades biológicas;
- II. Posteriormente, comparar a capacidade proliferativa e senescência de culturas primárias de células pulpares humanas congeladas de pacientes com RNS e de indivíduos saudáveis com o intuito de identificar alterações relacionadas à mutação do gene *FAM20C*;
 - a. Determinar e comparar o tempo de dobra populacional a partir da terceira até a sétima passagem celular;
 - b. Determinar e comparar a porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase na terceira, quinta e sétima passagem celular;
 - c. Avaliar a expressão relativa dos genes *P21 (CDKN1A)*, *P16 (CDKN2A)*, *CICLINA D1*, *IL1B*, *IL6* na quinta passagem.

4. MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP/FM – UnB), parecer 967.387/2015 (ANEXO A). Todos participantes foram informados sobre o objetivo da pesquisa, seus possíveis riscos, benefícios e aspectos éticos envolvidos e registraram seu consentimento por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

4.2. PARTICIPANTES DA PESQUISA

4.2.1. Indivíduos Saudáveis

A fim de verificar o efeito da criopreservação sobre a proliferação e senescência e com o objetivo de estabelecer um grupo controle comparativo, polpas dentárias de indivíduos jovens (idade entre 20 e 25 anos), saudáveis e que não faziam uso de medicações foram obtidas de terceiros molares hígidos, extraídos por indicação cirúrgica. No total, foram utilizadas culturas primárias de 5 participantes: C1 (feminino, 23 anos), C2 (masculino, 21 anos), C3 (masculino, 24 anos), C4 (masculino, 22 anos) e C5 (feminino, 21 anos). Dessas, 4 (C1-C4) foram estabelecidas no presente trabalho e uma (C5) foi previamente estabelecida e criopreservada.

4.2.2. Pacientes com Síndrome de Raine (RNS)

Para avaliar a capacidade proliferativa e o perfil de senescência de células pulpares de pacientes com RNS, foram utilizadas culturas primárias de 2 indivíduos (RNS1 e RNS2) não correlacionados e portadores de diferentes mutações em homozigose no gene *FAM20C*. As polpas dentárias foram obtidas de dentes extraídos por razões terapêuticas na clínica de Atendimento a Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias na Unidade de Saúde Bucal de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), Brasília, Brasil. As características dos participantes

(sexo; idade no momento da coleta; tipo de mutação) bem como o dente de origem e data da coleta encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Informações sobre os pacientes com RNS

Participante	Sexo	Idade (anos)	Mutação	Dente	Data da coleta
RNS1	Feminino	24	c.784+5G>C (sítio de <i>splicing</i>)	38	18/05/2017
RNS2	Masculino	13	c.1487C>T p.Pro496Leu	47	27/01/2016

4.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Dois desenhos experimentais foram idealizados e executados a fim de responder às duas perguntas formuladas no presente trabalho.

Inicialmente, para avaliar se as condições de estocagem de células pulpares primárias poderiam alterar as propriedades biológicas de proliferação, levando à senescência celular, 4 culturas controle frescas e congeladas (C1, C2, C3, C4) e uma cultura RNS fresca e congelada (RNS1) foram utilizadas para realização dos experimentos. Para os experimentos com as culturas controle, células congeladas por um período menor que um ano (C1, C2, C3 e C4) foram comparadas com as suas respectivas populações frescas. Além disso, células congeladas por um período superior a um ano (C2) foram comparadas com as populações frescas (somente com a C2 ou com as 4 culturas frescas, C1, C2, C3 e C4). Já para os experimentos com a cultura RNS1, células congeladas apenas por período maior que um ano foram comparadas com a população fresca.

Para execução do segundo objetivo proposto, alíquotas congeladas por um período superior a um ano das 2 culturas RNS (RNS1 e RNS2), foram comparadas com duas populações de células controle (C2 e C5), congeladas também por um período superior a 1 ano.

4.4. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS

Imediatamente após a extração, os dentes foram transferidos para tubos cônicos do tipo Falcon™ de 15 mL (KASVI), contendo 5 mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco®, Invitrogen) gelado complementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; v/v; Gibco®, Invitrogen), 100 U/mL de penicilina (*Sigma-Aldrich*), 100 µg/mL de estreptomicina (*Sigma-Aldrich*) e 1% de anfotericina B (Gibco®, Invitrogen), denominado meio de estabelecimento de cultura. Em seguida, os tubos foram transportados em gelo para o Laboratório de Histopatologia Bucal da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) da UnB para processamento da amostra. No laboratório, os dentes foram desinfetados com álcool 70% e os tecidos moles residuais foram removidos com curetas periodontais. Com o auxílio de fórceps, alavanca e martelo, os dentes foram seccionados e a polpa do seu interior coletada para o estabelecimento de culturas por meio da técnica explante, isto é, a partir do cultivo de pequenos fragmentos de polpa dentária (87) (Figura 2). Em capela de fluxo laminar, as polpas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, Invitrogen) e, então, seccionadas em pequenos fragmentos com a ajuda de duas lâminas de bisturi (*Solidor®, Sizhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltd.*). Os fragmentos foram transferidos para placas de cultura de 6 poços (KASVI) na quantidade de, no mínimo, 3 fragmentos por poço e, em seguida, fixados com lamínula de vidro previamente esterilizada. Por fim, foram adicionados 2 mL de meio de estabelecimento de cultura em cada poço e as placas foram mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de CO₂ e em ambiente umidificado para o crescimento celular, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 ou 4 dias.

Atingida confluência de cerca de 90%, as células foram removidas das placas por meio da adição de solução de tripsina a 0,5 % (p/v; *Sigma-Aldrich*) e 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; *Sigma-Aldrich*) e subcultivadas (5x10⁵ células/placa) em placas de 100 mm (KASVI) contendo meio de cultura padrão, constituído por DMEM, 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Após completa expansão, as células foram novamente tripsinizadas e parte delas foi subcultivada para realização dos experimentos com as culturas frescas enquanto a outra parte foi criopreservada para posterior utilização. Cada processo de tripsinização e subcultura foi considerado uma passagem celular, sendo a “passagem 0” definida como a de estabelecimento da cultura.

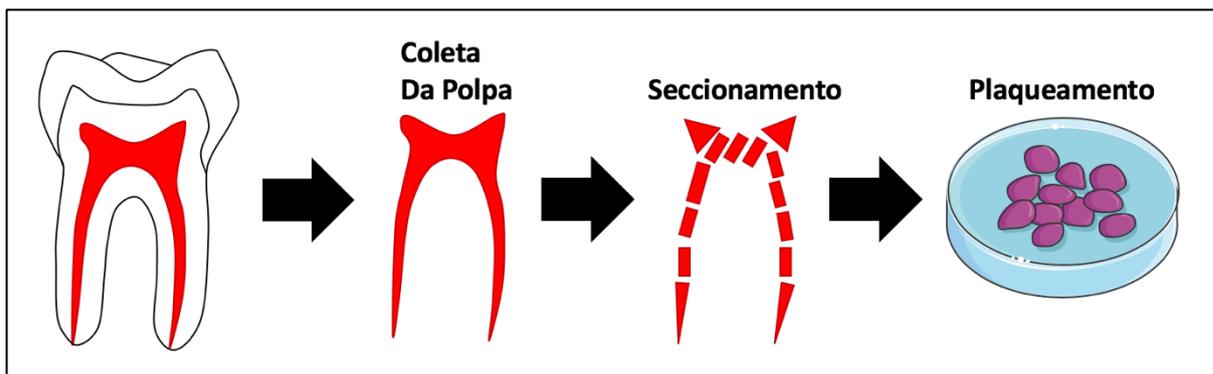


Figura 2 - Representação esquemática do estabelecimento de culturas primárias pela técnica de explante. Autoria própria.

4.5. CRIOPRESERVAÇÃO

As culturas foram congeladas (1×10^6 células/mL) na segunda passagem em solução de congelamento constituída por SFB e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (v/v; *Sigma-Aldrich*) em criotubos (*KASVI*) de 2 mL. Os criotubos foram transferidos para cuba de congelamento Mr. Frosty® (*Nalgene*®, *Sigma-Aldrich*) e mantidos em freezer a -80°C *overnight*, a fim de proporcionar congelamento lento na taxa de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Após esse período, as amostras foram removidas do recipiente de congelamento e estocadas em caixas de armazenamento no freezer a -80°C até o momento de sua utilização. Os tempos de congelamento de cada cultura estão detalhados na tabela 4.

4.6. DESCONGELAMENTO

Para o descongelamento, as alíquotas de células foram removidas do freezer a -80°C e imediatamente transferidas para banho maria a 37°C . Após constatação visual do completo descongelamento (aproximadamente 2 minutos), a suspensão de células foi diluída em 5mL de meio de cultura padrão e, posteriormente, centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura padrão e semeadas em placas de cultura de 100 mm para expansão e posterior realização dos experimentos.

Tabela 3 - informações sobre o tempo de congelamento de cada cultura

Cultura	Tempo de congelamento	
	< 1 ano	≥ 1 ano
C1	9 meses e 10 dias	--
C2	7 meses e 27 dias	1 ano e 2 meses
C3	7 meses e 27 dias	--
C4	7 meses e 27 dias	--
C5	--	1 ano e 4 meses
RNS1	--	1 ano
RNS2	--	1 ano e 8 meses

4.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DOBRA POPULACIONAL

A capacidade proliferativa de cada cultura ao longo das passagens foi determinada por meio do cálculo do tempo de dobra populacional (*doubling time*, DT), que representa uma estimativa do tempo necessário para as células em cultura duplicarem sua população (88). Para isso, células frescas ou congeladas a partir da passagem 3 foram semeadas em placas de 100 mm (5×10^5 células/placa) e cultivadas em meio de cultura padrão por 6 a 8 dias, sendo o meio trocado a cada 2 dias. Após atingido o estado de subconfluência, as células foram tripsinizadas, coletadas e quantificadas por meio da utilização de câmara de Neubauer e microscopia de luz invertida com contraste de fase. Em seguida, parte das células foi utilizada para execução dos demais experimentos e a outra parte foi novamente semeada em placas de 100 mm (5×10^5 células/placa). O protocolo de cultivo e contagem foi então sequencialmente repetido a cada passagem celular até que o número de células se tornasse um fator limitador para realização dos experimentos. A contagem obtida em cada passagem celular foi utilizada para determinação do DT, que foi calculado utilizando fórmula proposta por Roth, V., em 2006 (89):

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

O desenho experimental para determinação do DT a cada passagem celular bem como para realização dos demais experimentos encontra-se esquematizado na figura 3.

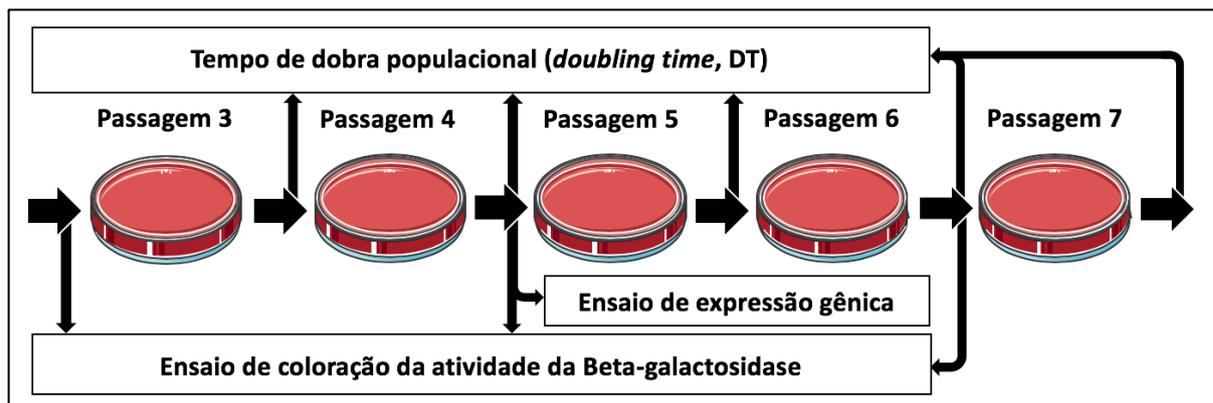


Figura 3 - Representação esquemática do desenho experimental do presente estudo.

4.8. AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA

4.8.1. Ensaio colorimétrico da atividade da enzima beta-galactosidase

O ensaio de coloração da beta-galactosidase foi realizado com intuito de confirmar a presença de células com acúmulo dessa enzima nos lisossomos, o que, segundo a literatura, é uma das características apresentadas por células senescentes (90). Para isso, células frescas ou congeladas, nas passagens 3, 5 e 7, foram semeadas em placas de 24 poços (15×10^3 células/poço) e cultivadas em 1 mL de meio de cultura padrão, por um período de 3 dias. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e a atividade da enzima beta-galactosidase foi avaliada utilizando-se o kit *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (*Cell Signaling Technology*). A execução do protocolo seguiu as instruções recomendadas pelo fabricante com algumas adaptações: as células foram fixadas com 150 μ L de solução fixadora/permeabilizante por 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, lavadas com solução de PBS. Posteriormente, foram adicionados 150 μ L de solução corante a base de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo) por poço e as placas foram envolvidas internamente com papel filme e externamente com laminado e mantidas em incubadora a 37°C com 5% CO₂ *overnight*. Finalizado o tempo de coloração, as células foram observadas e foram realizadas fotografadas em cada poço (região central da placa) sempre com o mesmo aumento, utilizando microscópio de luz invertido com contraste de fase *Axio Observer D1* (*Zeiss*). Em cada microfotografia, as células coradas em tom azul/verde foram contadas 2 vezes, separadamente, por 2 operadores. A média das 4 contagens foi

normalizada pela estimativa do número total de células presente na imagem, utilizando o programa *ImageJ* (Wayne Rasband).

4.8.2. Ensaio de expressão gênica

O ensaio de expressão gênica foi realizado para verificar a expressão de genes do ciclo celular (*P21*, *P16* e *CICLINA D1*) e da inflamação (*IL1B* e *IL6*) relacionados com o processo de senescência. Para esse ensaio, células frescas ou congeladas (passagem 5) foram semeadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/poço) e cultivadas em 2 mL de meio de cultura padrão por 3 dias. Posteriormente, as células foram coletadas para extração do RNA total.

4.8.2.1. 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 a 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 ressuscitado 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.

4.8.2.2. Quantificação e pureza do RNA total

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 o valor da razão ficou entre 1,6 e 2,2.

4.8.2.3. Tratamento do RNA total com DNase I e síntese do DNA complementar (cDNA)

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*) em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a enzima foi inativada por meio da adição de 1 μL de tampão de inativação contendo 50 nM de EDTA (*Sigma-Aldrich*) e pelo aquecimento das amostras a 70°C por 10 minutos. 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*) e seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foram adicionados, nas amostras, 2 μL de *primers* de sequências randômicas, 0,8 μL de solução contendo nucleotídeos (dNTP Mix), 3,2 μL de água milli-Q estéril tratada com 0,1% (v/v) de DEPC (*Sigma-Aldrich*) e 1 μL de enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*, resultando em um volume final de 20 μL . Posteriormente, as amostras foram convertidas em termociclador (*Bio-Rad, Hercules, CA, EUA*) com o seguinte protocolo: 10 min a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Finalizada a conversão, os cDNAs foram estocados em freezer a -20°C.

4.8.2.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Para realização da qPCR, 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)*, *P16 (CDKN2A)*, *CICLINA D1*, *IL1B*, *IL6* e *BETA ACTINA (ACTB)*; constitutivo e normalizador das reações), descritos na tabela 5. Os desenhos de todos os *primers* foram obtidos a partir do banco de *primers PrimerBank* (91) e testados in silico 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 (*KASVI*), contendo, em cada poço, 4,1 µL de água milli-Q estéril tratada com 0,1% (v/v) de DEPC. (*Sigma-Aldrich*); 0,2 µL (100 nM) de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 5,0 µL de *PowerUp SYBR Green Master Mix* e 0,5 µL de cDNA. 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: 50°C por 2 minutos (atividade da enzima uracil-DNA glicosilase), 95°C por 2 minutos (ativação da enzima *Dual-Lock® DNA polimerase*), seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). Ao final da reação, os dados foram obtidos com o programa *Software StepOne v2.1* (*Thermo Fischer Scientific*). A quantificação relativa dos genes de interesse foi realizada utilizando o método de comparação do Ct (*cycle threshold*, ou ciclo limiar) ou $\Delta\Delta Ct$ (92). Os valores de Ct obtidos para os genes de interesse foram normalizados 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 $-\Delta Ct$ (93).

Tabela 4 - Relação de primers utilizados na PCRq.

Gene	Sequência (5'-> 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>P21 (CDKN1A)</i>	F: TGTCCGTCAGAACCCATGC R: AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC	139
<i>P16 (CDKN2A)</i>	F: ATGGAGCCTTCGGCTGACT R: GTAAC TATTCGGT GCGTTGGG	108
<i>CICLINA D1</i>	F: GCTGCGAAGTGGAAACCATC R: CCTCCTTCTGCACACATTTGAA	135
<i>IL1B</i>	F: ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA R: GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	132
<i>IL6</i>	F: CCTGAACCTTCCAAAGATGGC R: TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA	75
<i>BETA ACTINA</i>	F: TCACCCACACTGTGCCCATCTACG R: CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG	295

pb, pares de base.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad* versão 6.0 para *Mac*. Para análise estatística dos ensaios de coloração da beta-galactosidade e de expressão gênica, utilizou-se os testes não paramétricos de *Wilcoxon* pareado (2 grupos de comparação pareados), *Mann-Whitney* (2 grupos de comparação) ou *Kruskal-Wallis* seguido de comparação múltipla de Dunn (3 grupos de comparação). O critério de significância considerado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DO CONGELAMENTO A -80°C SOBRE A PROLIFERAÇÃO E SENESCÊNCIA DE CÉLULAS PULPARES

5.1.1. Efeito do congelamento sobre a capacidade proliferativa

5.1.1.1. Culturas primárias controle

O congelamento em freezer a -80°C por menos de um ano parece não interferir nos tempos de dobra populacional nas passagens analisadas, ao menos para 2 (C2 e C3) das 4 culturas controle avaliadas (Tabela 6 e Figura 4). Análise estatística das culturas controle congeladas e frescas não demonstrou diferença ($p < 0,05$). No entanto, as culturas C1 e C4 tiveram tempos de dobra populacional variáveis ao longo das passagens analisadas, independente do congelamento, já que tanto as populações frescas quanto congeladas apresentaram padrão de dobra heterogêneo e distinto (Tabela 6 e Figura 4). Em relação as culturas C2 e C3, essas tiveram tempos de dobra populacional similares entre os grupos congelado e fresco e também entre elas (Tabela 6 e Figura 4). Assim, uma delas, a cultura C2, foi utilizada para avaliar o efeito do congelamento por um período superior a 1 ano.

Tabela 5 - Tempo de dobra populacional (*doubling time*, DT), em dias, das culturas controle fresca e congelada (por menos de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).

CULTURAS	PASSAGENS/DT (DIAS)				
	3	4	5	6	7
C1 FRESCA	5,83	5,70	6,75	10,68	3,71
C1 CONGELADA	6,65	7,00	5,58	7,43	11,19
C2 FRESCA	2,59	2,73	3,27	4,23	4,45
C2 CONGELADA	2,93	3,35	4,42	3,42	3,55
C3 FRESCA	2,48	2,78	3,56	3,92	3,57
C3 CONGELADA	2,75	3,20	2,96	3,71	3,71
C4 FRESCA	3,44	3,68	3,69	9,99	5,35
C4 CONGELADA	4,84	4,56	23,91	4,38	11,97

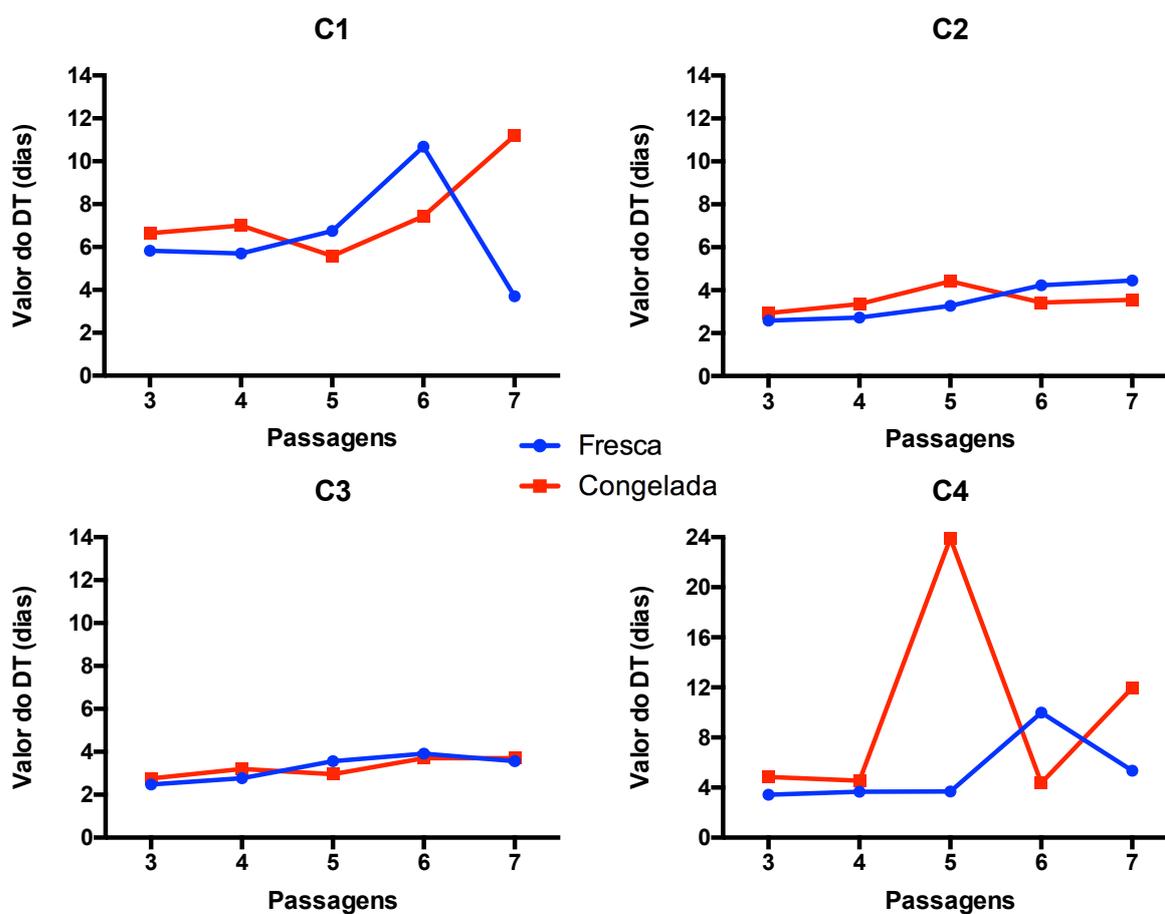


Figura 4 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (3, 4, 5, 6 e 7) das culturas primárias controle frescas e congeladas por menos de 1 ano (C1, C2, C3 e C4). N=1 para cada passagem celular.

De forma semelhante, o congelamento por um período superior a 1 ano pareceu não interferir nos tempos de dobra da população estudada. Os valores de DT bem como o padrão ao longo das passagens avaliadas foram similares entre os grupos de células congeladas e frescas (Tabela 7 e Figura 5).

Tabela 6 - Tempo de dobra populacional (*doubling time*, DT), em dias, da cultura controle C2 fresca e congelada (por mais de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).

CULTURAS	PASSAGENS/DT (DIAS)				
	3	4	5	6	7
C2 FRESCA	2,59	2,73	3,27	4,23	4,45
C2 CONGELADA	2,86	3,40	3,44	3,87	3,69

C2

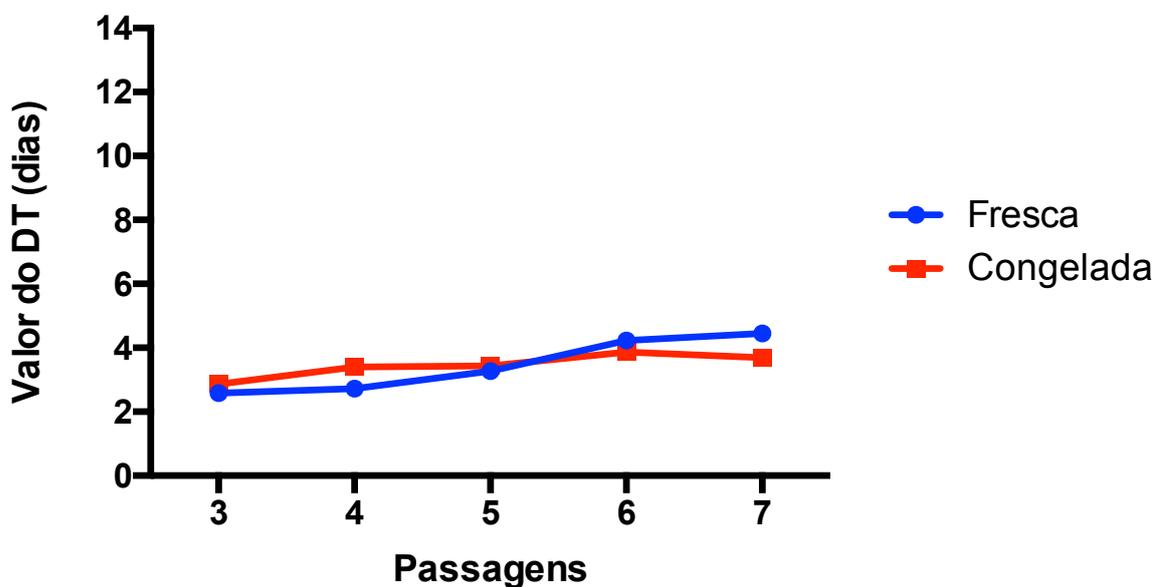


Figura 5 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (3, 4, 5, 6 e 7) da cultura primária controle C2 fresca e congelada por mais de 1 ano. N=1 para cada passagem celular.

5.1.1.2. Cultura primária RNS1

O congelamento em freezer a -80°C por mais de um ano parece não interferir na capacidade proliferativa da cultura primária sindrômica RNS1. Os tempos de dobra populacional nas passagens avaliadas foram similares entre os grupos de células congeladas e frescas, exceto para passagem 7, na qual foi observado DT maior para população fresca em relação a congelada (Tabela 8 e Figura 6).

Tabela 7 - Tempo de dobra populacional (*doubling time*, DT), em dias, da cultura RNS1 fresca e congelada (por mais de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).

CULTURAS	PASSAGENS/DT (DIAS)				
	3	4	5	6	7
RNS1 FRESCA	2,67	2,75	3,07	3,71	7,72
RNS1 CONGELADA	2,62	3,18	3,27	3,81	4,62

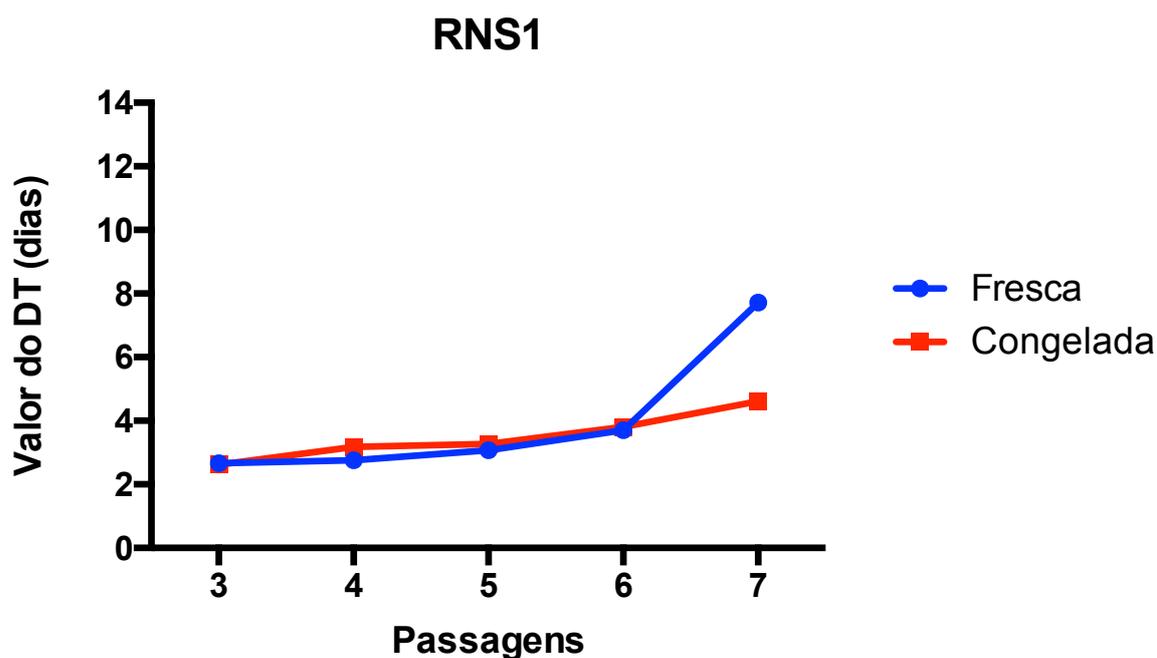


Figura 6 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (3, 4, 5, 6 e 7) da cultura primária RNS1 fresca e congelada por mais de 1 ano. N= 1 por passagem celular.

5.1.2. Efeito do congelamento sobre a atividade enzimática da beta-galactosidase

5.1.2.1. Culturas primárias controle

O congelamento em freezer a -80°C por um período inferior a um ano parece não interferir na atividade da beta-galactosidase nas passagens avaliadas (Figura 7). Embora seja possível observar uma maior porcentagem de células coradas no grupo congelado, além de uma maior amplitude de valores, esses não foram estatisticamente significativos quando comparados com o grupo de células frescas (Figura 7).

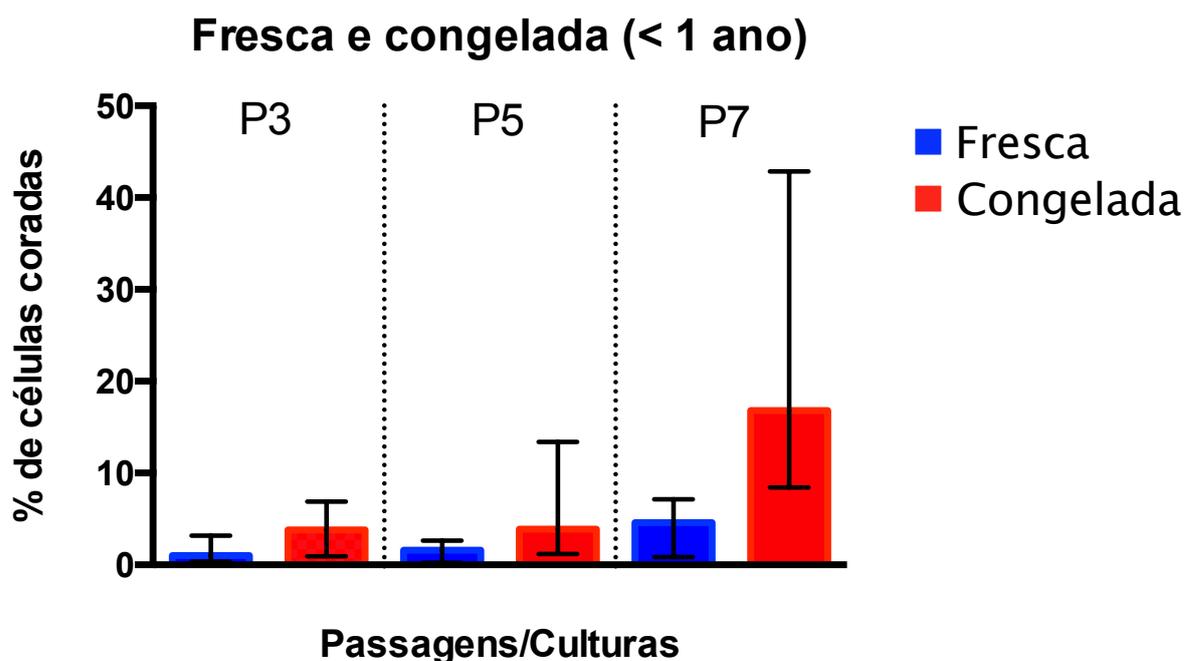


Figura 7 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase de 4 culturas primárias controle frescas e congeladas por menos de um ano (C1, C2, C3 e C4). Culturas primárias nas passagens 3, 5 e 7 foram semeadas em placas de 24 poços e, após 3 dias, fixadas e coradas com solução corante a base de X-GAL para evidenciar em azul/verde células com atividade aumentada da enzima beta-galactosidase. Após coloração, a região central de cada poço foi fotografada em microscópio de luz invertido com contraste de fase e o número de células coradas presente na imagem foi normalizado pelo o número total de células estimado na microfotografia. N=4 por grupo, por passagem celular. Dados apresentados como mediana e amplitude. $P > 0.05$ por teste não paramétrico de Wilcoxon pareado.

O efeito do congelamento a -80°C sobre o número de células senescentes foi avaliado também para um período superior a um ano, comparando o número de células com atividade aumentada da beta-galactosidase da cultura C2 congelada com as culturas frescas relacionadas (C1, C2, C3, C4). Não houve diferença estatística entre as culturas frescas e congelada (Figuras 8 e 9).

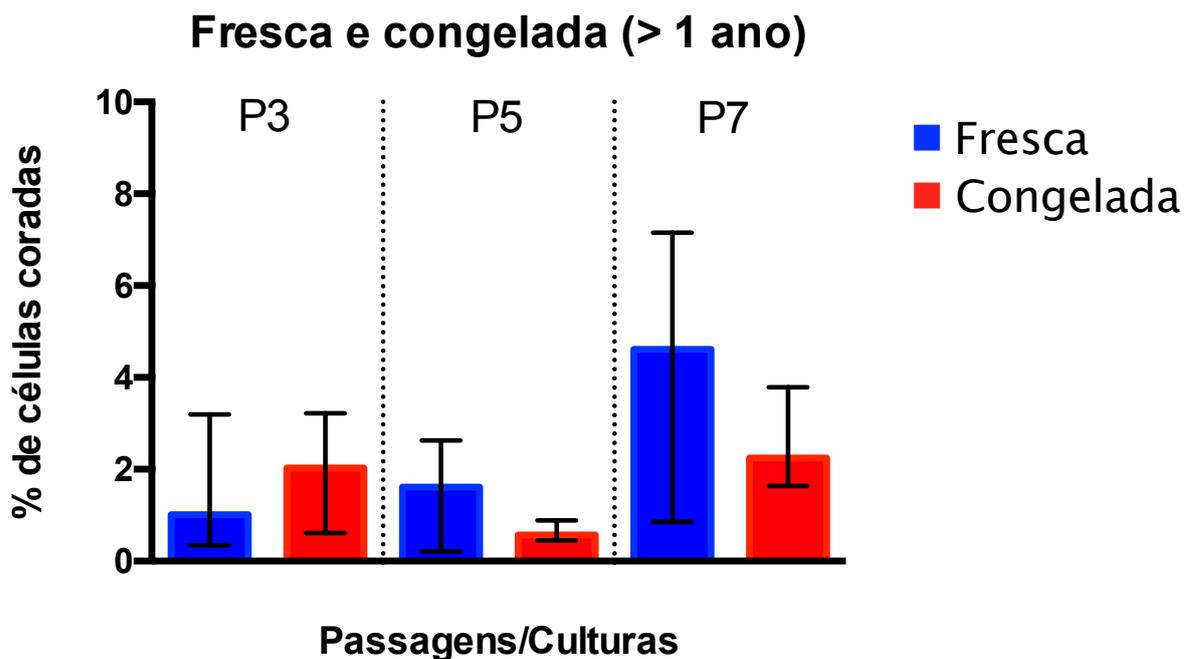


Figura 8 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase em culturas primárias controle frescas (C1, C2, C3 e C4) e congelada (C2) por mais de um ano. Culturas primárias nas passagens 3, 5 e 7 foram semeadas em placas de 24 poços e, após 3 dias, fixadas e coradas com solução corante a base de X-GAL para evidenciar em azul/verde células com atividade aumentada da enzima beta-galactosidase. Após coloração, a região central de cada poço foi fotografada em microscópio de luz invertido com contraste de fase e o número de células coradas presente na imagem foi normalizado pelo o número total de células estimado na microfotografia. N=4 por grupo, por passagem celular. Dados apresentados como mediana e amplitude. $P > 0.05$ por teste não paramétrico de Mann-Whitney.

5.1.2.2. Cultura primária RNS1

O ensaio colorimétrico para atividade da beta-galactosidase mostrou que cultura primária sindrômica RNS1 congelada por mais de um ano apresentou menor porcentagem ($p < 0,05$) de células senescentes (coradas em azul/verde) na passagem 5 em relação a cultura fresca (Figuras 10 e 11).

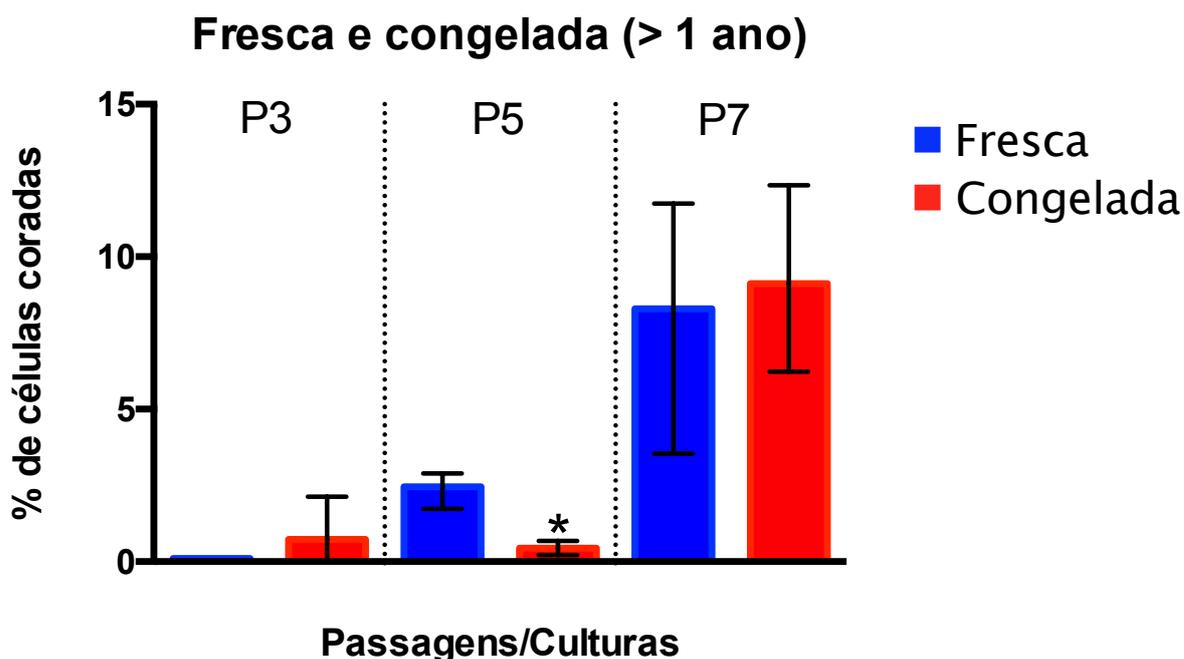


Figura 10 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase em cultura primária RNS1 fresca e congelada por mais de um ano. Cultura primária RNS1 nas passagens 3, 5 e 7 foi semeada em placas de 24 poços e, após 3 dias, fixada e corada com solução corante a base de X-GAL para evidenciar em azul/verde células com atividade aumentada da enzima beta-galactosidase. Após coloração, a região central de cada poço foi fotografada em microscópio de luz invertido com contraste de fase e o número de células coradas presente na imagem foi normalizado pelo o número total de células estimado na microfotografia. N=4 por grupo, por passagem celular. Dados apresentados como mediana e amplitude. * $P < 0,05$ vs “fresca” por teste não paramétrico de Mann-Whitney.

5.1.3. Efeito do congelamento sobre a expressão de genes relacionados com a senescência

5.1.3.1. Culturas primárias controle

A análise da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *P21* (*CDKN1A*), *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* demonstrou não haver diferenças significativas entre os grupos de células congeladas e frescas, na passagem 5, para os dois tempos de congelamento avaliados, isso é, inferior a um ano (Figura 12) e superior a um ano (Figura 13). Os valores de Ct obtidos para *P16* (*CDKN2A*) foram indeterminados.

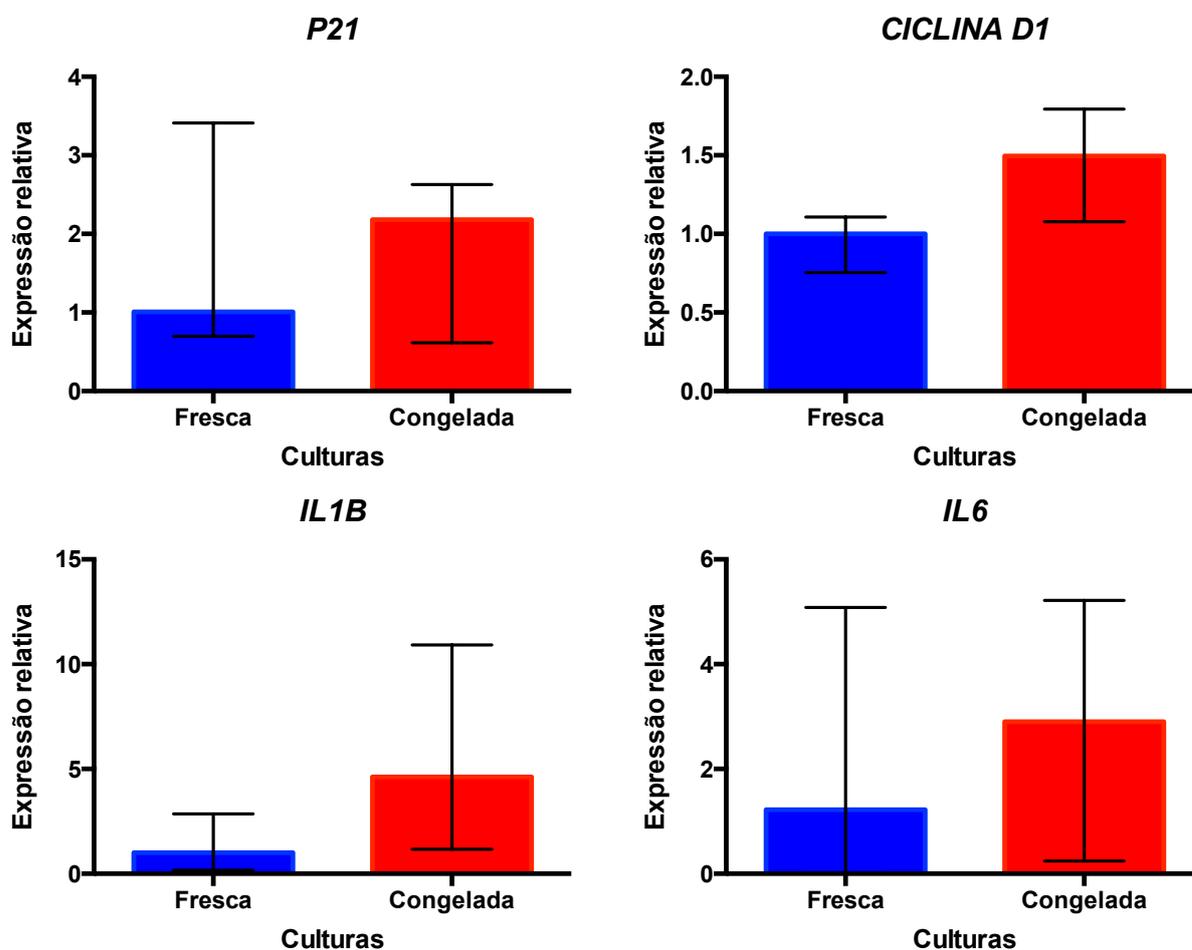


Figura 12 - Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado nas culturas controle frescas e congeladas por menos de um ano (C1, C2, C3 e C4). Culturas primárias, na passagem 5, foram semeadas em placas 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 Mann-Whitney.

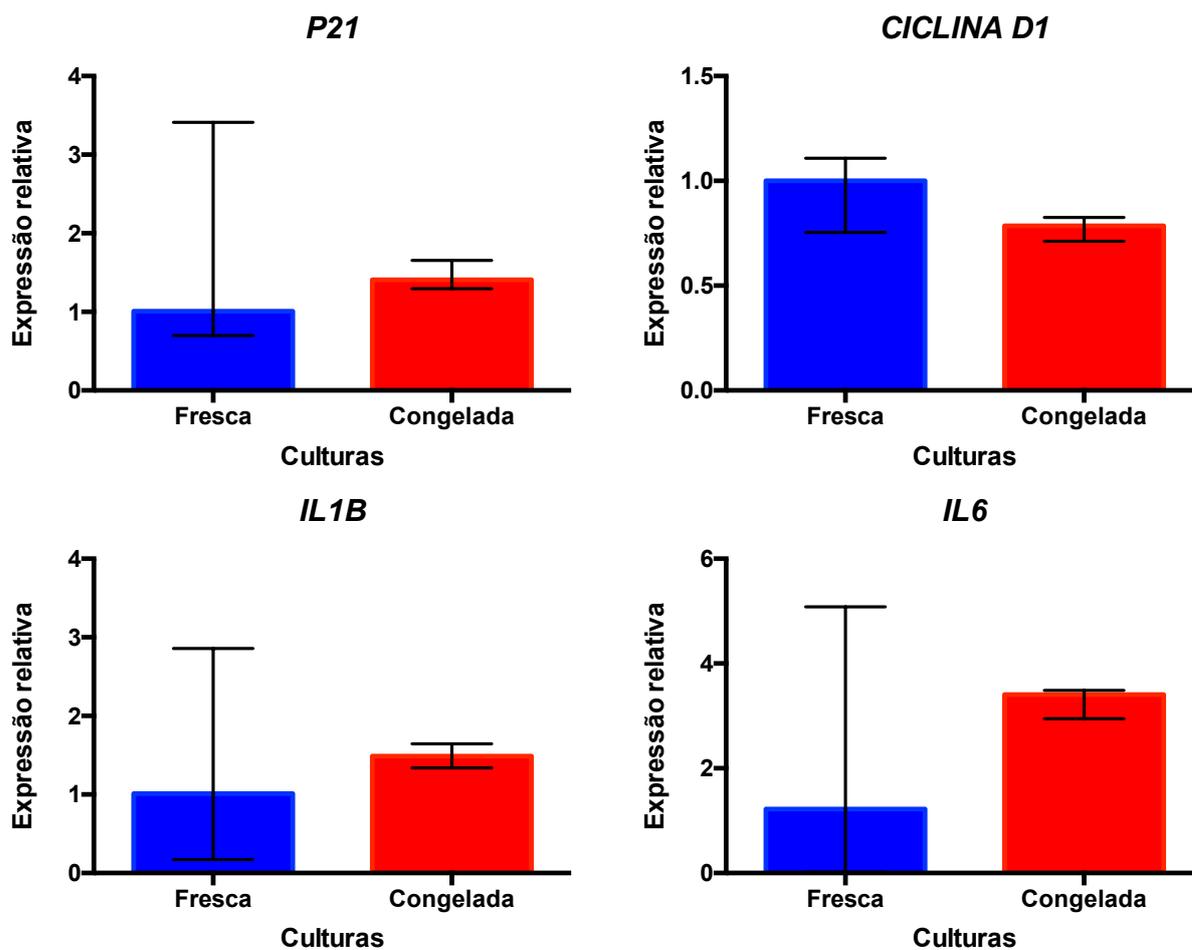


Figura 13 - Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado nas culturas controle frescas C1, C2, C3 e C4 e na cultura controle C2 congelada por mais de um ano. Culturas primárias, na passagem 5, 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 Mann-Whitney.

5.1.3.2. Cultura primária RNS1

Semelhante às culturas controle, não houve diferença estatística entre a expressão do RNA mensageiro de *P21* (*CDKN1A*), *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* do grupo de células congeladas em relação ao grupo de células frescas (Figura 14).

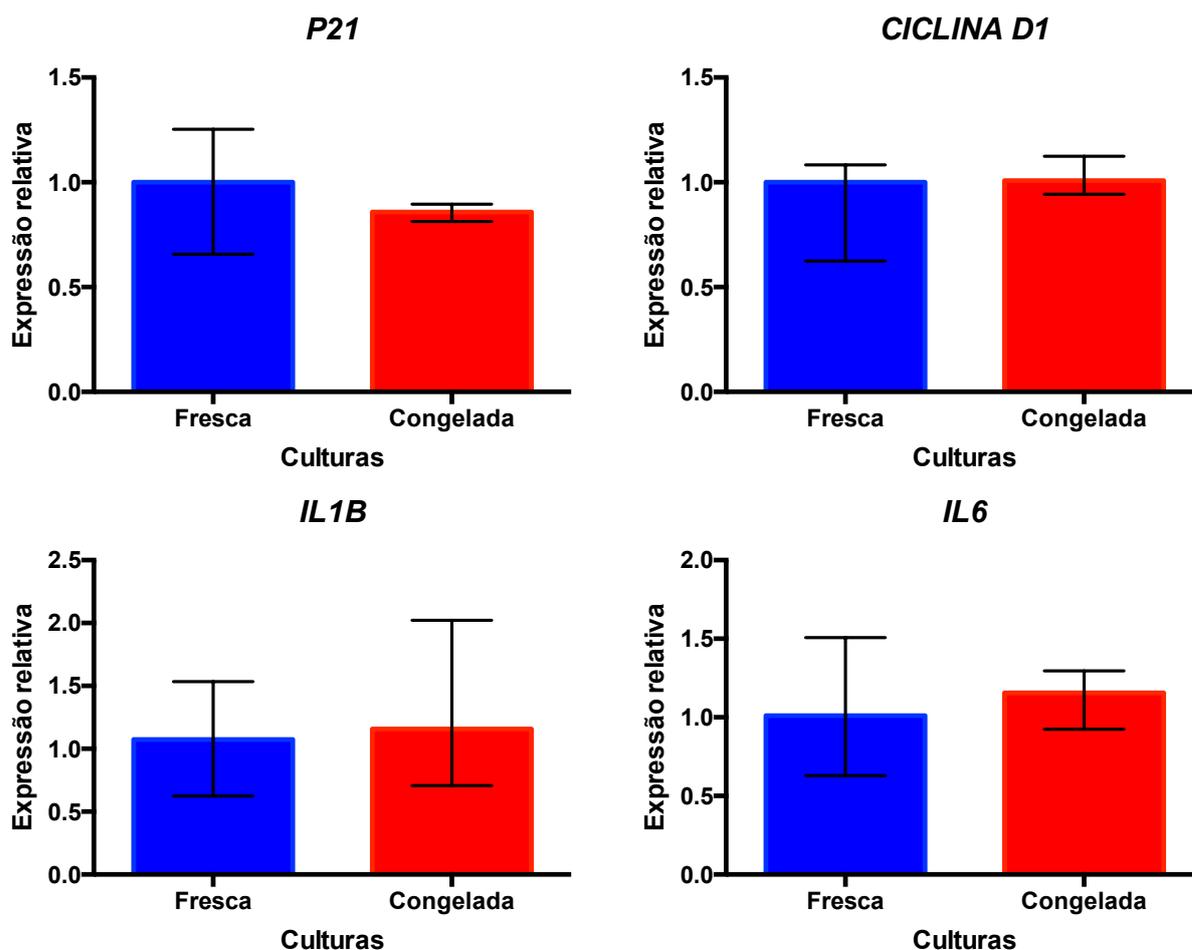


Figura 14 - Representação gráfica da expressão relativa do RNA mensageiro dos genes *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* obtida por meio de ensaio RT-qPCR, realizado na cultura RNS1 fresca e congelada por mais de um ano. Cultura primária RNS1, na passagem 5, foi semeada em placas de 6 poços, cultivada por 3 dias e, após, coletada 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 Mann-Whitney.

5.2. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA E SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS PULPARES CONGELADAS DE PACIENTES SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM SÍNDROME DE RAINE

5.2.1. Capacidade proliferativa

Culturas primárias de células sindrômicas RNS1 e RNS2 apresentaram padrão proliferativo comparável ao padrão de culturas controle (C2 e C5), nas passagens avaliadas. Os tempos de dobra populacional, ao longo das passagens, das culturas RNS foi semelhante aos das culturas controle (Tabela 9 e Figura 15).

Tabela 8 - Tempo de dobra populacional (*doubling time*, DT), em dias, das culturas controle e RNS frescas e congeladas (por mais de um ano) nas passagens estudadas (3, 4, 5, 6 e 7).

CULTURAS	PASSAGENS/DT (DIAS)				
	3	4	5	6	7
C2	2,86	3,40	3,44	3,87	3,69
C5	4,44	3,27	3,00	3,27	3,75
RNS1	2,62	3,18	3,27	3,81	4,62
RNS2	3,09	2,97	3,30	3,52	3,45

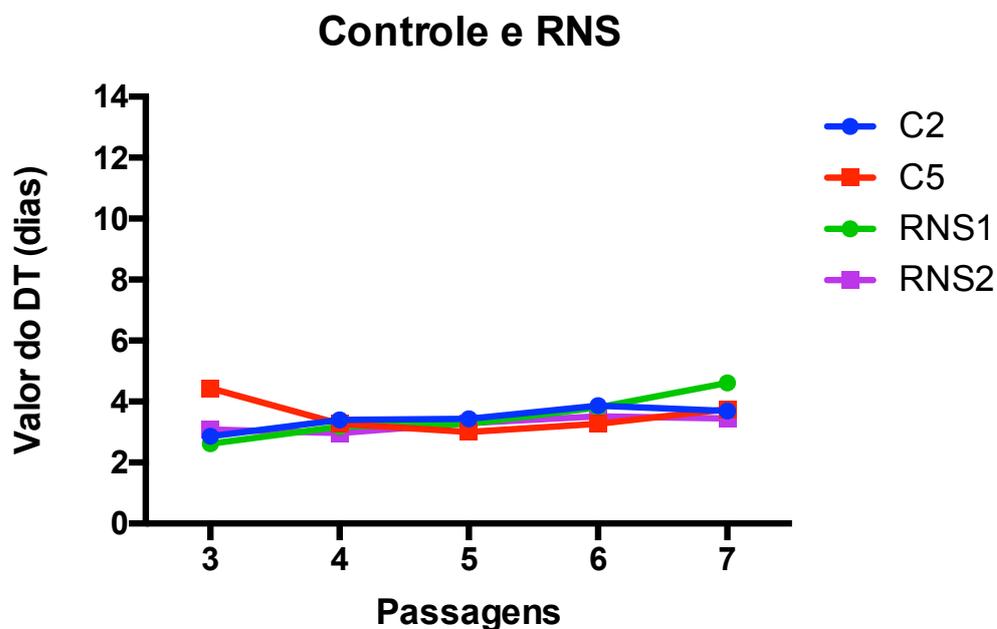


Figura 15 - Representação gráfica do tempo de dobra populacional (DT; em dias) em relação às passagens avaliadas (passagens 3, 4, 5, 6 e 7) das culturas controle (C2 e C5) e RNS (RNS1 e RNS2). N=1 por passagem celular.

5.2.2. Senescência

O ensaio de senescência por meio da mensuração colorimétrica da atividade da beta-galactosidase sugeriu diferenças entre o número de células coradas nas populações sindrômicas e no controle. Em relação a cultura primária RNS1, essa apresentou uma porcentagem significativamente maior ($p < 0,05$) de células coradas na passagem 7 quando comparadas com o grupo controle. Quanto a população RNS2, um maior número ($p < 0,05$) de células coradas pôde ser observado na passagem 5 em relação ao grupo controle (Figuras 16 e 17). Na passagem 7, embora a porcentagem de células coradas seja visualmente maior no grupo RNS2 em relação ao controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Como não foi possível expandir o suficiente as culturas RNS2 e C5 para realização do ensaio na passagem 3, apenas as passagens 5 e 7 foram analisadas para essas culturas.

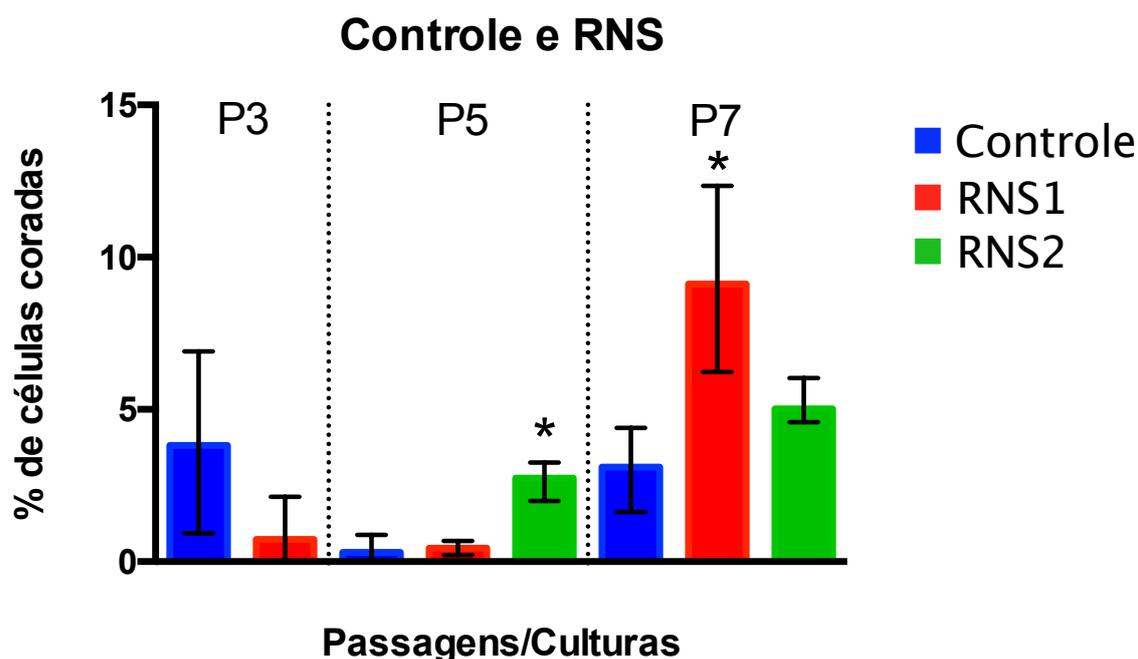


Figura 16 - Representação gráfica da porcentagem de células coradas pelo ensaio de atividade da beta-galactosidase em culturas controle (C2 na passagem 3 ou C2 e C5 em conjunto nas passagens 5 e 7) e RNS (RNS1 e RNS2), nas passagens 3, 5 e 7. Culturas primárias RNS1, RNS2 e controles (C2 e C5), nas passagens 3, 5 e 7 foram semeadas em placas de 24 poços e, após 3 dias, fixadas e coradas com solução corante a base de X-GAL para evidenciar em azul/verde células com atividade aumentada da enzima beta-galactosidase. Após coloração, a região central de cada poço foi fotografada em microscópio de luz invertido com contraste de fase e o número de células coradas presente na imagem foi normalizado pelo o número total de células estimado na microfotografia. N=4 por grupo, por passagem celular, com exceção do grupo controle nas passagens 5 e 7 (n=8). Dados apresentados como mediana e amplitude. * $P < 0,05$ vs controle por teste não paramétrico Mann-Whitney (passagem 3) ou Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn (passagens 5 e 7).

5.2.3. Expressão gênica relacionada à senescência

A análise da expressão relativa de genes relacionados com a senescência demonstrou perfis diferentes entre as populações RNS1 e RNS2 na passagem 5. A cultura primária RNS1 apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) da expressão de *IL6* em relação ao grupo controle, não havendo diferenças para os demais genes analisados. Na cultura RNS2 houve uma expressão significativamente maior ($p < 0,05$) dos genes *P21* (*CDKN1A*), *CICLINA D1* e *IL1B* quando comparados com o controle (Figura 18).

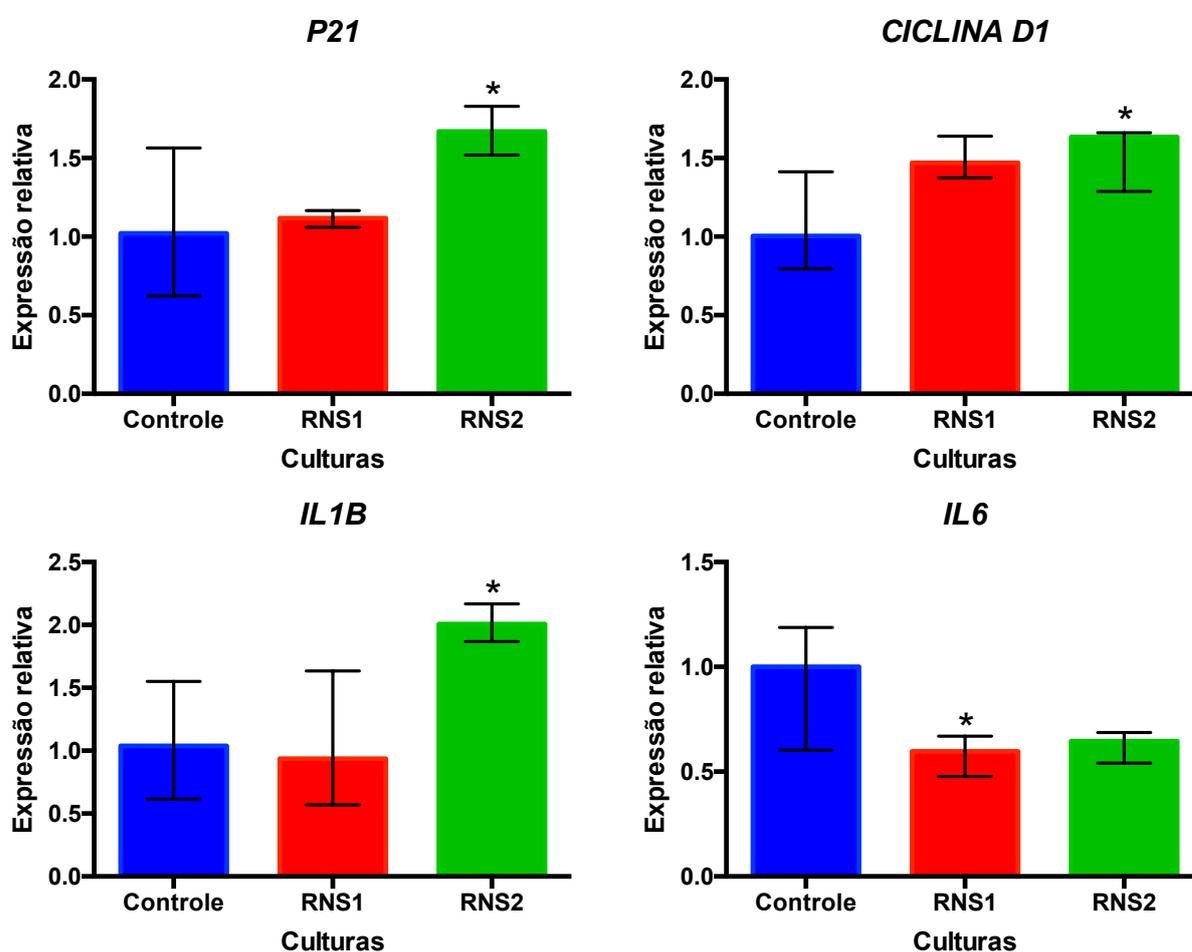


Figura 18 - Representação gráfica da expressão relativa, na quinta passagem, dos genes *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* obtida por meio de ensaio RT-qPCR realizado nas culturas primárias controle (C2 e C5), e RNS (RNS1 e RNS2). Culturas primárias RNS1, RNS2 e controles (C2 e C5), na passagem 5, foram semeadas em placas de 6 poços, cultivadas por 3 dias e, após, coletadas para extração do RNA total seguida de RT-qPCR. N= 4 para os grupos RNS1 e RNS2 e N=8 para o grupo controle. Dados apresentados como mediana e amplitude da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). * $P < 0,05$ vs controle por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn.

6. DISCUSSÃO

A RNS é uma doença genética rara caracterizada pela presença de osteoesclerose e anomalias craniofaciais, com a existência de dois fenótipos, um letal, caracterizado pela morte perinatal, e outro não letal, com relatos de indivíduos que alcançaram a idade adulta (1-3). Em 2015, Acevedo *et al.* relataram os casos de duas famílias brasileiras não relacionadas que apresentavam RNS não letal. A análise molecular identificou duas mutações recessivas nessas famílias. Na primeira família (RNS1), os três irmãos afetados apresentaram mutação em homozigose no sítio de *splicing* do gene *FAM20C*, localizada entre os exons 1 e 2 (c.784+5G>C). Esses indivíduos apresentavam fenótipo atenuado caracterizado por dismorfia facial leve, problemas auditivos e alterações orodentárias como micrognatia, palato ogival, má oclusão, amelogênese imperfeita hipoplásica, dentina interglobular, além de abscessos periapicais recorrentes. Na segunda família (RNS2), nos dois irmãos afetados, foi identificada mutação em homozigose no exon 9 do gene *FAM20C*, correspondendo à região de sítio catalítico (c.1487C>T; p.Pro496Leu). Eles apresentavam convulsões recorrentes, baixa estatura, problemas respiratórios, raquitismo hipofosfatêmico, hipomineralização dos ossos longos, problemas de visão e anomalias craniofaciais como craniosinostose, calcificações intracranianas, hipoplasia do terço médio da face e manifestações orodentárias como micrognatia, palato ogival, hiperplasia gengival, dentes permanentes retidos, amelogênese imperfeita hipoplásica, defeitos na formação radicular e na mineralização dentinária, além de abscessos periapicais recorrentes (4). As manifestações orodentárias descritas em pacientes com RNS também foram descritas em camundongos nocaute para *Fam20C* com a presença de defeitos de formação e mineralização do esmalte e dentina, além de processos patológicos pulpares (18, 62).

Com o intuito de entender melhor as alterações do complexo dentina polpa, no âmbito da dissertação de Mestrado de Cantarutti, em 2016, foi estabelecida cultura primária de um dos pacientes da família RNS2, descrita por Acevedo *et al.*, em 2015. A caracterização dessas células demonstrou redução da atividade metabólica mitocondrial, alterações no citoesqueleto, redução da capacidade migratória celular e redução no potencial de mineralização quando comparadas com células controle de indivíduos saudáveis, sugerindo fenótipo de células senescentes (4, 20). Esses

resultados levantaram a pergunta em relação ao efeito do método de congelamento em freezer a -80°C usado no laboratório. Estudos *in vitro* sugerem que as condições de criopreservação e descongelamento são estressores celulares que podem promover a senescência, além disso, outros autores têm sugerido que oscilações de temperatura durante a criopreservação, que são uma realidade em amostras congeladas em freezers -80°C , podem causar morte celular e alterações nas propriedades biológicas das células em cultura (23-25, 94).

Portanto, o primeiro objetivo desse trabalho foi avaliar se as condições de congelamento interferem na capacidade proliferativa e senescência de culturas primárias. Para isso, foram estabelecidas 4 culturas primárias de células pulpares de indivíduos saudáveis (C1-C4) e uma de paciente da família RNS1, de acordo com o protocolo previamente realizado no estudo de Cantarutti, 2016 (20).

A cultura celular vem sendo usada por muitos anos como ferramenta de estudo de processos biológicos e representa um importante recurso para estudar e analisar diversos comportamentos celulares. A respeito da polpa dentária, o uso de cultura primária de células pulpares é amplo, sendo que, nos últimos anos, tem se destacado o estudo de células-tronco progenitoras da polpa. O estabelecimento de cultura primária de células pulpares permite a obtenção de uma população celular heterogênea que inclui fibroblastos, células de defesa, células mesenquimais indiferenciadas e células vasculares e perivasculares (95, 96). Além disso, cultura primária de células da polpa são ferramentas úteis para estudar as propriedades biológicas intrínsecas das células que compõem o tecido pulpar, como a capacidade proliferativa e o perfil de senescência (72, 75, 97).

As técnicas mais usadas para o estabelecimento de culturas primárias de células pulpares são a digestão enzimática e explante (98-110). A digestão enzimática é caracterizada pelo uso de uma enzima proteolítica com a finalidade de separar as células de um tecido para posterior cultivo (109, 110). Já a técnica por explante consiste no uso de fragmentos de tecido fixados em placa de cultura de modo que permita que os processos de migração e proliferação aconteçam, transferindo e expandindo as células presentes no fragmento. Em relação à técnica por explante, estudos *in vitro* bovino e humano demonstraram que as culturas celulares de polpa apresentam propriedades semelhantes às apresentadas no tecido pulpar *in vivo*, sugerindo que a cultura celular possa ser uma ferramenta válida e adequada para o estudo de condições fisiopatológicas relacionadas com o complexo dentina polpa (87,

111-113). No presente estudo, a técnica por explante foi escolhida pela simplicidade de execução e pelo baixo custo.

O ensaio de DT foi o método escolhido para avaliar a capacidade proliferativa devido a simplicidade, baixo custo e possibilidade de acompanhamento progressivo durante as passagens. Esse ensaio consiste no cálculo estimado do tempo necessário para determinada população realizar uma dobra populacional (88). O cálculo do DT é importante para determinar a diminuição da capacidade proliferativa ligada à senescência replicativa (90, 114). No presente estudo, quando comparados os valores de DT entre culturas frescas e congeladas por menos de um ano, percebeu-se que duas culturas (C1 e C4) apresentavam DTs variáveis ao longo das passagens, enquanto outras duas (C2 e C3) apresentaram DTs similares. No entanto, quando realizada análise estatística entre as culturas frescas e congeladas, essas populações não apresentaram diferença significativa. Não foi possível encontrar na literatura estudos que avaliassem os valores de DT em culturas primárias de células pulpares, sendo apenas encontrados artigos relacionados à caracterização de células-tronco mesenquimais isoladas. No entanto, a partir de dados obtidos em um estudo de caracterização de cultura primária pulpar, foi possível calcular a estimativa do DT, que demonstrou, nessas células, DT entre 6,30 e 6,50 dias nas passagens 1 e 5 de cultivo celular (115). Esses valores foram semelhantes apenas aos DTs da cultura C1, sendo que todas as outras culturas apresentaram valores menores (entre 2,48 e 4,45 dias). Quando comparados aos valores de DTs obtidos em estudos de caracterização de células-tronco pulpares, esses descreveram valores de DT consideravelmente menores (15-50 horas) (116). Esses dados sugerem que as culturas primárias estabelecidas no presente estudo parecem apresentar dois padrões distintos de proliferação, um irregular e com valor de DT mais elevado e um que apresenta crescimento linear, com valores de DT mais baixos, podendo esses padrões estarem relacionados com a heterogeneidade apresentada em cultura de células primárias.

Em seguida, foi realizada a comparação entre células frescas e congeladas por mais de um ano tanto da cultura C2, que apresentou, no ensaio anterior, valores de DT similares, quanto da cultura RNS1. As células frescas e congeladas de ambas as culturas apresentaram valores de DT parecidos, com exceção da cultura RNS1 na passagem 7. Não foram encontrados ensaios semelhantes na literatura, no entanto, estudos sobre o efeito do congelamento utilizando freezer a -80°C e nitrogênio líquido por até dois anos não demonstraram alterações nas propriedades biológicas de

células-tronco dentárias (117-120). Em concordância com esses estudos, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o congelamento por aproximadamente um ano e meio não interfere na capacidade proliferativa das células estudadas. Porém, ao menos para as culturas primária controle, estudos com mais culturas são necessários para confirmar estatisticamente os resultados demonstrados. A execução de novos experimentos com as culturas RNS é limitada pela raridade da síndrome e pelo fato de que as amostras de tecido pulpar apenas podem ser coletadas no momento de uma extração dentária realizada por indicação terapêutica.

A senescência celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico da atividade da enzima beta-galactosidase, a qual encontra-se em níveis aumentados nos lisossomos de células senescentes (121). A maioria dos estudos de senescência utilizam essa metodologia para ilustração visual da senescência em culturas celulares, outros estudos, porém, utilizam essa mesma metodologia para o cálculo do número de células coradas, permitindo comparação numérica entre as culturas estudadas. No entanto, poucos são os estudos que determinaram um valor para classificar as culturas entre senescentes e não senescentes. Um desses estudos sugeriu, para fibroblastos, o valor de 80% de células coradas como indicador de senescência em cultura. (122). No presente estudo, as células das culturas frescas e congeladas (por menos ou mais de um ano; controle e RNS) apresentaram número de células coradas inferior à 40% em todas as passagens analisadas. Além disso, não demonstraram diferença estatística, com exceção da cultura C2 congelada por mais de um ano, que apresentou, na quinta passagem, menor quantidade de células coradas em comparação com o grupo fresco. Esses resultados sugerem que o congelamento não tem efeito na senescência celular e que tanto as culturas frescas quanto congeladas, nas passagens analisadas, não apresentaram senescentes.

Duas vias de sinalização principais estão envolvidas no processo de senescência celular: a via de p53/p21 e a pRB/p16. Na via p53/p21, a p53 é proteína efetora que identifica os danos sofridos pelo DNA e ativa a expressão de p21. Danos ao DNA também induzem, em algumas células, a ativação de p16. Tanto a p21 quanto a p16 são inibidores de ciclinas dependentes de kinases (CDKs) e estão relacionadas com vias de interrupção do ciclo celular e, por consequência, senescência (66, 123). Até o presente, não existe nenhum marcador específico do estado senescente e os

autores relatam que nem todas as células senescentes expressam todos os possíveis marcadores de senescência (70).

Com o intuito de avaliar a expressão de genes que codificam proteínas relacionados à senescência, foi realizado, na passagem 5, ensaio expressão gênica por RT-qPCR dos genes *P21 (CDKN1A)*, *P16 (CDKN2A)*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6*. As culturas frescas e congeladas (controle e RNS) deste estudo foram comparadas quanto à expressão de *P21(CDKN1A)*, não apresentando diferença significativa. Em relação ao gene *P16 (CDKN2A)*, não foi possível amplificar o cDNA correspondente durante a fase de validação dos primers, impossibilitando a sua análise.

O gene *CICLINA D1* codifica uma proteína importante para a progressão do ciclo celular de G_0/G_1 para fase S (124). Entretanto, estudos com células da musculatura lisa vascular e fibroblastos demonstraram aumento da expressão de *CICLINA D1* e da proteína correspondente em células senescentes, sugerindo a utilização desses como possíveis biomarcadores de senescência replicativa (125, 126). Outro estudo, utilizando células epiteliais mamárias, sugeriu que a Ciclina D1 possivelmente está relacionada com a supressão de autofagia, podendo levar à senescência celular (127). A avaliação das culturas congeladas e frescas do controle e RNS1 não demonstraram diferença estatística.

As citocinas inflamatórias *IL1B* e *IL6* parecem estar envolvidas com o processo de senescência celular. Estudos de *microarray* sugerem que fibroblastos senescentes apresentam maior expressão de *IL1B* e *IL6* (128-131). Estudo de senescência em fibroblastos com estimulação pelo oncogene $BRAF^{E60}$ demonstrou papel importante da *IL6* na indução da senescência celular, mostrando que sua supressão permite a reentrada das células no ciclo celular com consequente retomada da proliferação (130). No presente trabalho, quando analisados ambos os genes nas culturas frescas e congeladas, não foi observado diferença estatística significativa. Logo, todos os resultados de expressão gênica sugerem que o congelamento a $-80^{\circ}C$ por aproximadamente um ano e meio não altera o perfil de senescência de culturas primárias pulparens avaliadas na quinta passagem tanto de indivíduos saudáveis quanto do indivíduo RNS1.

Considerando que os resultados mostraram não haver diferença na capacidade proliferativa e senescência entre células frescas e congeladas (C1-4 ou C2 e RNS1), foi levantada uma segunda pergunta em relação ao efeito de mutações no gene *FAM20C* sobre essas propriedades biológicas. Para esse propósito, células

congeladas (C2, C5, RNS1) e culturas previamente estabelecidas e congeladas por Cantarutti (RNS2 e C5), em 2016, foram avaliadas na segunda parte desse estudo (20).

O ensaio de DT, comparando as culturas controle e RNS, demonstrou valores similares em todas as passagens analisadas. Porém, quando avaliados os dados do ensaio colorimétrico da atividade da beta-galactosidase, a cultura RNS1, na passagem 5, e RNS2, na passagem 7, apresentaram porcentagem significativamente maior de células coradas em comparação com o controle. No entanto, todos os valores apresentados pelas culturas estudadas não ultrapassaram 15%, não sendo consideradas, portanto, senescentes segundo o estudo de Itahana *et al.*, em 2013 (122). Esses resultados sugerem que mesmo apresentando uma capacidade proliferativa semelhante ao controle, as culturas RNS parecem ser mais suscetíveis a senescência, principalmente nas passagens mais tardias. Entretanto, esses resultados discordam de um estudo recente sobre células pulpares humanas imortalizadas e nocaute para *FAM20C*, onde essas células, diferentemente do encontrado no presente estudo, apresentaram redução na proliferação celular (132).

O ensaio de expressão gênica foi realizado na quinta passagem para comparar a expressão dos genes *P21 (CDKN1A)*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* das culturas RNS com as culturas controle. Os resultados demonstraram expressão significativamente maior de *P21 (CDKN1A)*, *CICLINA D1* e *IL1B* na cultura RNS2, em comparação com o controle, e valores médios menores para *IL6*, porém sem diferença estatística. Em relação à cultura RNS1, essa não apresentou diferença estatística na expressão dos genes estudados, em relação ao controle, exceto para o gene *IL6*, que foi significativamente menor. Estudos de função da proteína FAM20C identificaram a atuação dessa quinase em diversas proteínas secretadas, entre elas a IL6 (tagliabratti 2012 e 2015). Isso poderia estar de alguma forma associado aos resultados da expressão de *IL6* apresentados pelas culturas RNS que, apesar de apenas a RNS1 ter apresentado significância estatística, ambas culturas parecem apresentar menor expressão desse gene, em comparação com o controle. Os resultados de expressão gênica sugerem que, na quinta passagem, embora a cultura RNS2 não seja senescente, ela apresenta sinais de expressão aumentada de genes ligados à senescência, concordando com os resultados apresentados pelo ensaio de coloração da beta-galactosidase referente à passagem 5. O fato de apenas a cultura RNS2 ter apresentado diferença estatística em quatro dos genes estudados, pode estar

associado à diferença dos fenótipos apresentados pelos pacientes com RNS. O paciente RNS2, diferentemente do RNS1, apresentava desregulação dos níveis séricos de fosfato, além de defeitos mais graves no complexo dentina-polpa.

Diante dos resultados apresentados, sugere-se estudo detalhado da expressão gênica e proteica relacionada às vias de senescência das quais participam as proteínas P21, P16 e IL6 nas culturas de células pulpares dos pacientes com RNS, a fim de melhor elucidar o impacto de mutações na FAM20C sobre o processo de senescência celular, além de melhor compreender o efeito da FAM20C sobre a expressão gênica de IL6, que apresentou menor expressão nas culturas RNS analisadas.

Este estudo apresentou algumas limitações. A análise da capacidade proliferativa não permitiu, pelo desenho experimental e número amostral, realizar teste estatístico nas culturas congeladas por mais de um ano. Ademais, os dados obtidos do ensaio colorimétrico da atividade da beta-galactosidase foram de apenas um campo visual, correspondendo ao centro de cada poço da placa de cultura, e a realização da contagem de células totais foi utilizando o programa *ImageJ*, que apresenta precisão limitada na contagem de células fusiformes e sobrepostas, como no caso dos fibroblastos pulpares. Em relação ao ensaio de expressão gênica, foram obtidas replicatas biológicas de apenas duas culturas de indivíduos saudáveis congeladas por mais de um ano. O aumento do número de culturas comparáveis no grupo de indivíduos saudáveis poderia melhor representar a variação natural da expressão dos marcadores analisados.

7. SÍNTESE DOS RESULTADOS

Quanto ao efeito do congelamento a -80°C em células pulpares humanas de pacientes saudáveis e com RNS:

- A avaliação do DT demonstrou, em células controle congeladas por menos de um ano, valores similares em todas as passagens analisadas (3-7) para duas (C2 e C3) das quatro culturas estudadas, em comparação com as culturas frescas, porém, também apresentou DT variável, com padrão heterogêneo e distinto, para duas culturas controle congeladas e frescas (C1 e C4; congelado e fresco). A avaliação do DT em culturas congeladas RNS (RNS1) ou controle (C2) por mais de um ano apresentou valores similares em todas as passagens analisadas (3-7) em comparação com as culturas frescas.
- A avaliação da porcentagem de células coradas por meio do ensaio da atividade da beta-galactosidase nas culturas frescas e congeladas (C1-4 e RNS1; < e > 1 ano) não demonstrou diferença em todas as passagens avaliadas (3, 5 e 7), com exceção da cultura RNS1 na passagem 5, que apresentou, na cultura congelada (> 1 ano), menor porcentagem de células senescentes;
- A avaliação da expressão dos genes *P21 (CDKN1A)*, *CICLINA D1*, *IL1B* e *IL6* em culturas de células pulpares frescas e congeladas (C1-4 e RNS1) não demonstrou diferença.

Quanto à comparação das culturas congeladas (> 1 ano) de cultura primária de células pulpares humanas com RNS (RNS1 e RNS2) e de indivíduos saudáveis (C2 e C5):

- As culturas RNS apresentaram valores de DT similares aos valores dos controles;
- As culturas RNS1 (passagem 7) e RNS2 (passagem 5) apresentaram maior porcentagem de células coradas para atividade da beta-galactosidase, em relação ao controle;
- A cultura primária RNS2 apresentou, na passagem 5, maior expressão de *P21*, *CICLINA D1*, *IL1B* e a cultura primária RNS1 apresentou menor expressão de *IL6*, ambas em comparação com o controle.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que:

- O congelamento em freezer a -80°C por mais de um ano não altera as propriedades biológicas relacionadas à capacidade proliferativa e senescência das células de indivíduos saudáveis e com RNS.
- Culturas primárias de células pulparens (RNS2) de paciente com síndrome de Raine por mutação no *FAM20C* (c.1487C>T ; p.Pro496Leu) apresentaram alteração no processo de senescência, com mudança no perfil de expressão gênica de genes relacionados à senescência, porém sem comprometimento da capacidade proliferativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raine J, Winter RM, Davey A, Tucker SM. Unknown syndrome: microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. *Journal of medical genetics*. 1989;26(12):786-8.
2. Sheth J, Bhavsar R, Gandhi A, Sheth F, Pancholi D. A case of Raine syndrome presenting with facial dysmorphism and review of literature. *BMC medical genetics*. 2018;19(1):76.
3. 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. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2018.
4. Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, de Lima CL, Castro LC, Yamaguti PM, et al. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC medical genetics*. 2015;16(1):8.
5. Rafaelsen SH, Raeder H, Fagerheim AK, Knappskog P, Carpenter TO, Johansson S, et al. Exome sequencing reveals FAM20c mutations associated with fibroblast growth factor 23-related hypophosphatemia, dental anomalies, and ectopic calcification. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013;28(6):1378-85.
6. Fradin M, Stoetzel C, Muller J, Koob M, Christmann D, Debry C, et al. Osteosclerotic bone dysplasia in siblings with a Fam20C mutation. *Clinical genetics*. 2011;80(2):177-83.
7. Kochar GS, Choudhary A, Gadodia A, Gupta N, Simpson MA, Crosby AH, et al. Raine syndrome: a clinical, radiographic and genetic investigation of a case from the Indian subcontinent. *Clinical dysmorphology*. 2010;19(3):153-6.
8. Simpson MA, Scheuerle A, Hurst J, Patton MA, Stewart H, Crosby AH. Mutations in FAM20C also identified in non-lethal osteosclerotic bone dysplasia. *Clinical genetics*. 2009;75(3):271-6.

9. Hulskamp G, Wieczorek D, Rieder H, Louwen F, Hornig-Franz I, Rickert CH, et al. Raine syndrome: report of a family with three affected sibs and further delineation of the syndrome. *Clinical dysmorphology*. 2003;12(3):153-60.
10. Simpson MA, Hsu R, Keir LS, Hao J, Sivapalan G, Ernst LM, et al. Mutations in FAM20C are associated with lethal osteosclerotic bone dysplasia (Raine syndrome), highlighting a crucial molecule in bone development. *American journal of human genetics*. 2007;81(5):906-12.
11. Elalaoui SC, Al-Sheqaih N, Ratbi I, Urquhart JE, O'Sullivan J, Bhaskar S, et al. Non lethal Raine syndrome and differential diagnosis. *European journal of medical genetics*. 2016;59(11):577-83.
12. Kinoshita Y, Hori M, Taguchi M, Fukumoto S. Functional analysis of mutant FAM20C in Raine syndrome with FGF23-related hypophosphatemia. *Bone*. 2014;67:145-51.
13. Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, Manning G, Irvine KD. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. *PLoS One*. 2012;7(8):e42988.
14. Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(20):12723-7.
15. Sloan A. Chapter 29. *Biology of the Dentin-Pulp Complex* 2015. 371-8 p.
16. Butler WT. Dentin matrix proteins. *European journal of oral sciences*. 1998;106 Suppl 1:204-10.
17. Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, Wiley SE, Worby CA, Kinch LN, et al. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science (New York, NY)*. 2012;336(6085):1150-3.
18. Wang X, Wang S, Lu Y, Gibson MP, Liu Y, Yuan B, et al. FAM20C plays an essential role in the formation of murine teeth. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(43):35934-42.
19. Tagliabracci VS, Wiley SE, Guo X, Kinch LN, Durrant E, Wen J, et al. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell*. 2015;161(7):1619-32.
20. Cantarutti ALL. CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES DE PACIENTE COM MUTAÇÃO NO GENE FAM20C [Dissertação de mestrado]: Universidade de Brasília; 2016.

21. Fusenig NE, Boukamp P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular carcinogenesis*. 1998;23(3):144-58.
22. Yaswen P, Stampfer MR. Molecular changes accompanying senescence and immortalization of cultured human mammary epithelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2002;34(11):1382-94.
23. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology*. 2003;5(8):741-7.
24. Falk M, Falkova I, Kopečna O, Bacikova A, Pagacova E, Simek D, 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):14694.
25. Honda S, Weigel A, Hjelmeland LM, Handa JT. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(2):493-8.
26. Nanci A. Structure of the oral tissues. *Ten Cate's Oral Histology* 2012. p. 1-13.
27. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1996;7(2):104-33.
28. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1993;4(5):679-728.
29. Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation; research in biological diversity*. 1981;18(2):75-88.
30. Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol*. 2003;48(1):1-14.
31. Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *The International journal of developmental biology*. 1995;39(1):281-90.
32. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian dental journal*. 2007;52(1 Suppl):S4-16.

33. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(8):1367-73.
34. Goldberg M, Lasfargues JJ. Pulpo-dentinal complex revisited. *Journal of dentistry*. 1995;23(1):15-20.
35. Morse DR. Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1991;72(6):721-45.
36. Goldberg M, Smith AJ. CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2004;15(1):13-27.
37. Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators of inflammation*. 2015;2015:347649.
38. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of dentistry*. 2000;28(2):77-92.
39. Shields ED, Bixler D, el-Kafrawy AM. A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. *Arch Oral Biol*. 1973;18(4):543-53.
40. de La Dure-Molla M, Philippe Fournier B, Berdal A. Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification. *European journal of human genetics : EJHG*. 2015;23(4):445-51.
41. Opsahl Vital S, Gaucher C, Bardet C, Rowe PS, George A, Linglart A, et al. Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone*. 2012;50(4):989-97.
42. Kingston HM, Freeman JS, Hall CM. A new lethal sclerosing bone dysplasia. *Skeletal radiology*. 1991;20(2):117-9.
43. Kan AE, Kozlowski K. New distinct lethal osteosclerotic bone dysplasia (Raine syndrome). *American journal of medical genetics*. 1992;43(5):860-4.
44. Patel PJ, Kolawole TM, al-Mofada S, Malabarey TM, Hulailah A. Osteopetrosis: brain ultrasound and computed tomography findings. *European journal of pediatrics*. 1992;151(11):827-8.
45. Al Mane KA, Coates RK, McDonald P. Intracranial calcification in Raine syndrome. *Pediatric radiology*. 1996;26(1):55-8.

46. Shalev SA, Shalev E, Reich D, Borochowitz ZU. Osteosclerosis, hypoplastic nose, and proptosis (Raine syndrome): further delineation. *American journal of medical genetics*. 1999;86(3):274-7.
47. Acosta AX, Peres LC, Chimelli LC, Pina-Neto JM. Raine dysplasia: a Brazilian case with a mild radiological involvement. *Clinical dysmorphology*. 2000;9(2):99-101.
48. Mahafza T, El-Shanti H, Omari H. Raine syndrome: report of a case with hand and foot anomalies. *Clinical dysmorphology*. 2001;10(3):227-9.
49. Al-Gazali LI, Jehier K, Nazih B, Abtin F, Haas D, Sadaghatian R. Further delineation of Raine syndrome. *Clinical dysmorphology*. 2003;12(2):89-93.
50. Gunes T, Kurtoglu S, Cetin N, Ozturk MA, Topaloglu N. Raine syndrome associated with cytomegalovirus infection. *The Turkish journal of pediatrics*. 2005;47(1):89-91.
51. Chitayat D, Shannon P, Keating S, Toi A, Blaser S, Friedberg T, et al. Raine syndrome: a rare lethal osteosclerotic bone dysplasia. Prenatal diagnosis, autopsy, and neuropathological findings. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143a(24):3280-5.
52. Koob M, Doray B, Fradin M, Astruc D, Dietemann JL. Raine syndrome: expanding the radiological spectrum. *Pediatric radiology*. 2011;41(3):389-93.
53. Takeyari S, Yamamoto T, Kinoshita Y, Fukumoto S, Glorieux FH, Michigami T, 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.
54. Mahmood N. Raine syndrome: a review and a report of metabolic bone disease as a new link. *Research*. 2014.
55. Ababneh FK, AlSwaid A, Youssef T, Al Azzawi M, Crosby A, AlBalwi MA. Hereditary deletion of the entire FAM20C gene in a patient with Raine syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2013;161A(12):3155-60.
56. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *BoneKEy reports*. 2014;3:497.
57. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(3):429-35.

58. Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M, et al. Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(19):17500-8.
59. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature genetics*. 2006;38(11):1310-5.
60. Ichikawa S, Gerard-O'Riley RL, Acton D, McQueen AK, Strobel IE, Witcher PC, et al. A Mutation in the Dmp1 Gene Alters Phosphate Responsiveness in Mice. *Endocrinology*. 2017;158(3):470-6.
61. Wang X, Wang J, Yuan B, Lu Y, Feng JQ, Qin C. Overexpression of Dmp1 fails to rescue the bone and dentin defects in Fam20C knockout mice. *Connect Tissue Res*. 2014;55(4):299-303.
62. Vogel P, Hansen GM, Read RW, Vance RB, Thiel M, Liu J, et al. Amelogenesis imperfecta and other biomineralization defects in Fam20a and Fam20c null mice. *Veterinary pathology*. 2012;49(6):998-1017.
63. Liu P, Zhang H, Liu C, Wang X, Chen L, Qin C. Inactivation of Fam20C in cells expressing type I collagen causes periodontal disease in mice. *PLoS One*. 2014;9(12):e114396.
64. Narita M, Lowe SW. Senescence comes of age. *Nature medicine*. 2005;11(9):920-2.
65. Smith JR, Pereira-Smith OM. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5271):63-7.
66. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(9):729-40.
67. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120(4):483-95.
68. Ren JL, Pan JS, Lu YP, Sun P, Han J. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cellular signalling*. 2009;21(3):378-83.
69. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*. 2010;5:99-118.
70. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology*. 2011;192(4):547-56.

71. Kim JC, Lee YH, Yu MK, Lee NH, Park JD, Bhattarai G, et al. Anti-inflammatory mechanism of PPAR γ on LPS-induced pulp cells: role of the ROS removal activity. *Arch Oral Biol.* 2012;57(4):392-400.
72. Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Tan W, Huang D, et al. Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res.* 2014;356(2):369-80.
73. Feng G, Zheng K, Cao T, Zhang J, Lian M, Huang D, et al. Repeated stimulation by LPS promotes the senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF-kappaB-p53/p21 signaling. *Cytotechnology.* 2018;70(3):1023-35.
74. Li L, Zhu YQ, Jiang L, Peng W. Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. *International endodontic journal.* 2012;45(12):1074-9.
75. Lee YH, Kim GE, Cho HJ, Yu MK, Bhattarai G, Lee NH, et al. Aging of in vitro pulp illustrates change of inflammation and dentinogenesis. *J Endod.* 2013;39(3):340-5.
76. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science (New York, NY).* 1970;168(3934):939-49.
77. Sambu S. A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. *PeerJ.* 2015;3:e1039.
78. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:3-19.
79. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep.* 1994;14(6):259-81.
80. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research.* 2017;6(1):12-8.
81. Hunt CJ. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods Mol Biol.* 2017;1590:41-77.
82. Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta.* 1953;11(1):28-36.
83. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta.* 1953;10(3):414-26.
84. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology.* 2007;67(1):81-9.
85. Stacey G. 15 Fundamental Issues for Cell Line Banks in Biotechnology and Regulatory Affairs 2004.

86. Sugiura K, Tortolani AJ, Sargent MG. Viability of various solid and ascites tumors after prolonged storage at -78 degrees C. *Cryobiology*. 1968;4(4):177-83.
87. Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcified tissue international*. 2000;66(2):129-38.
88. Kim DK. Statistical methods for estimating doubling time in in vitro cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1997;33(4):289-93.
89. Roth V. Doubling Time [Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
90. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Cell senescence culturing methods. *Methods Mol Biol*. 2013;1048:1-10.
91. Wang X, Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic acids research*. 2003;31(24):e154.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.
93. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*. 2006;7:85.
94. Pogozykh D, Pogozykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):66.
95. Fitzgerald M, Chiego DJ, Jr., Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*. 1990;35(9):707-15.
96. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res*. 1987;66(6):1149-53.
97. Suchanek J, Soukup T, Visek B, Ivancakova R, Kucerova L, Mokry J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2009;153(1):31-5.
98. Tziafas D, Amar S, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV. Effects of glycosaminoglycans on in vitro mouse dental cells. *Arch Oral Biol*. 1988;33(10):735-40.

99. Veron MH, Couble ML, Caillot G, Hartmann DJ, Magloire H. Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingiva fibroblasts grown on fibronectin substrate. *Arch Oral Biol.* 1990;35(7):565-9.
100. Nakashima M. Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. *Arch Oral Biol.* 1991;36(9):655-63.
101. Nakashima M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1992;73(4):484-9.
102. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol.* 1991;36(2):117-28.
103. Liang RF, Nishimura S, Sato S. Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on insulin-induced differentiation in rat dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 1992;37(10):789-95.
104. Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 1994;39(6):481-9.
105. Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Developmental biology.* 1994;162(1):18-28.
106. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K, et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. *J Dent Res.* 1994;73(9):1509-14.
107. Eslaminejad MB, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *Journal of dentistry (Tehran, Iran).* 2010;7(4):185-95.
108. Tsai AI, Hong HH, Lin WR, Fu JF, Chang CC, Wang IK, et al. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2851906.
109. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell proliferation.* 2017;50(2).

110. Jang JH, Lee HW, Cho KM, Shin HW, Kang MK, Park SH, et al. In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. *Restorative dentistry & endodontics*. 2016;41(4):283-95.
111. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 1992;37(12):1045-55.
112. About I, Bottero M-J, de Denato P, Camps J, Franquin J-C, Mitsiadis TA. Human Dentin Production in Vitro. *Experimental Cell Research*. 2000;258(1):33-41.
113. Stanislawski L, Carreau JP, Pouchelet M, Chen ZH, Goldberg M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig*. 1997;1(3):131-40.
114. Crowe EP, Nacarelli T, Bitto A, Lerner C, Sell C, Torres C. Detecting senescence: methods and approaches. *Methods Mol Biol*. 2014;1170:425-45.
115. Lee DH, Kim NR, Ahn S-J, Yang H-C. Effect of passage number on human dental pulp cell proliferation and differentiation. *Biomater Res*. 2006;10:74-7.
116. Suchanek J, Soukup T, Ivancakova R, Karbanova J, Hubkova V, Pytlik R, et al. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta medica (Hradec Kralove)*. 2007;50(3):195-201.
117. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*. 2006;208(2):319-25.
118. Kumar A, Bhattacharyya S, Rattan V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(4):513-22.
119. Ginani F, Soares DM, Rabelo LM, Rocha HAO, de Souza LB, Barboza CAG. Effect of a cryopreservation protocol on the proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(8):598-604.
120. Huynh NC, Le SH, Doan VN, Ngo LTQ, Tran HLB. Simplified conditions for storing and cryopreservation of dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2017;84:74-81.
121. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*. 2007;371:21-31.

122. Itahana K, Itahana Y, Dimri GP. Colorimetric detection of senescence-associated beta galactosidase. *Methods Mol Biol.* 2013;965:143-56.
123. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene.* 2013;32(43):5129-43.
124. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004;145(12):5439-47.
125. Burton DG, Sheerin AN, Ostler EL, Smith K, Giles PJ, Lowe J, et al. Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1119:20-31.
126. Fukami J, Anno K, Ueda K, Takahashi T, Ide T. Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development.* 1995;81(2-3):139-57.
127. Brown NE, Jeselsohn R, Bihani T, Hu MG, Foltopoulou P, Kuperwasser C, et al. Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium. *Cancer research.* 2012;72(24):6477-89.
128. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology : CB.* 1999;9(17):939-45.
129. Yoon IK, Kim HK, Kim YK, Song IH, Kim W, Kim S, et al. Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Experimental gerontology.* 2004;39(9):1369-78.
130. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008;133(6):1019-31.
131. Mason DX, Jackson TJ, Lin AW. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene.* 2004;23(57):9238-46.
132. Liu C, Zhou N, Wang Y, Zhang H, Jani P, Wang X, et al. Abrogation of Fam20c altered cell behaviors and BMP signaling of immortalized dental mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 2018;363(2):188-95.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

Rubrica do participante: _____ Rubrica do pesquisador: _____

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.

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 _____.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP/FM – UnB (967.387/2015)

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Ana Carolina 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:** BRASILIA
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:** BRASÍLIA
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