

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/08/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FITOCISTATINAS SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE CATEPSINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM
CÉLULAS RAW 264.7 DE CAMUNDONGOS E SOBRE A PRODUÇÃO DE
TNF- α EM RATOS**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FITOCISTATINAS SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE CATEPSINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM
CÉLULAS RAW 264.7 DE CAMUNDONGOS E SOBRE A PRODUÇÃO DE
TNF- α EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: *Prof. Dr. Joni A. Cirelli*

Co-orientador: *Michel L. de Campos*

Araraquara

2017

Da Ponte Leguizamón, Natalia

Avaliação do efeito de fitocistatinas sobre a expressão génica de catepsinas e citocinas pró-inflamatórias em células RAW 264.7 de camundongos e sobre a produção de TNF- α em ratos / Natalia Da Ponte Leguizamón.-- Araraquara: [s.n.], 2017
49 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Co-Orientador: Michel Leandro de Campos

1. Citocinas 2. Catepsinas 3. Cistatinas I. Título

NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FITOCISTATINAS SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE CATEPSINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS
RAW 264.7 DE CAMUNDONGOS E SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF- α EM
RATOS

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2o Examinador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

3o Examinador: Prof. Dr. Flavio Henrique Silva

Araraquara, 20 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES

Natalia Da Ponte Leguizamón

Nascimento	24 de julho de 1986 Asunción, Paraguay
Filiação	Jorge Luis Da Ponte Gonzalez Maria Mercedes Leguizamón Zaván
2005-2010	Graduação em Odontologia Universidad Nacional de Asunción
2011-2013	Curso de Especialização em Reabilitação Oral Universidad Nacional de Asunción
2014	Curso de Didática Universitária Universidad Nacional de Asunción
2015-2017	Pos-Graduação em Periodontia Nível mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista- UNESP

DEDICATÓRIA

A DEUS, por me orientar nos caminhos percorridos e porque ele faz as coisas acontecerem.

Aos meus avos que me iluminam sempre e me acompanham por onde quer que eu vá.

À minha família, que me dão as forças para continuar sempre na frente, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Em especial aos meus queridos pais *Jorge e Tachi*, obrigada por acreditar em mim, sempre me apoiando para conseguir atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*, agradeço o imenso conhecimento transmitido. Serei eternamente grata por ter me aceito como a sua orientada e por me ensinar sempre com entusiasmo e motivação nesse processo de aprendizado.

Ao meu co-orientador *Michel Leandro de Campos*, agradeço pela paciência e pela humildade colocada no momento de me ensinar, e pela dedicação investida durante a execução desse trabalho.

À *Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini*, pela colaboração para o desenvolvimento dessa pesquisa, e ter me recebido gentilmente no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Ao *Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva* e à *Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes* do departamento de Genética e Evolução da UFSCAR, pela colaboração nesse trabalho, que com amabilidade desenvolveram e proporcionaram as fitocistatinas utilizadas nesse projeto.

À *Andressa Vilas Boas Nogueira*, agradeço a amizade e disponibilidade para me ensinar e ajudar durante todo este tempo.

A todos meus amigos de pós-graduação, pela amizade, momentos agradáveis e alegres de convivência. Obrigada pela ajuda e apoio em todo momento.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAR-UNESP, pela oportunidade de fazer parte como aluna da instituição e de contribuir de forma importante na minha formação acadêmica e desenvolvimento profissional.

Aos professores do departamento de Periodontia da FOAR por me proporcionarem o conhecimento e práticas válidas para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da Faculdade pela amizade e por estar em dispostos a ajudar.

Ao Programa de Bercas OEA-GCUB, que a través do apoio financeiro permitiu minha formação profissional e pessoal dentro do Brasil. Obrigada pela oportunidade.

À CNPq (Processo numero 486335/2013-5) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

“It always seems impossible until it is done”

Nelson Mandela

Da Ponte Leguizamón N. Avaliação do efeito de fitocistatinas sobre a expressão gênica de catepsinas e citocinas pró-inflamatórias em células raw 264.7 de camundongos e sobre a produção de $\text{tnf-}\alpha$ em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

As cisteíno-peptidases e as citocinas desempenham um papel importante no início e progressão dos processos imuno-inflamatórios, dentre estes, a doença periodontal. As fitocistatinas são cistatinas derivadas das plantas, inibidoras naturais das cisteíno-peptidases. Entre elas a Citrus CPI-2, derivada da laranja e a Cane CPI-4, derivada da cana-de-açúcar tem sido recentemente investigadas. O estudo das mesmas pode levar a novas terapias para o controle da doença periodontal, bem como outras doenças imuno-inflamatórias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito inibitório das fitocistatinas (Cane CPI-4 e Citrus CPI-2) sobre mediadores da inflamação. Em estudo in vitro, foi avaliado o efeito da atividade inibitória das fitocistatinas sobre a expressão gênica (RT-PCR em tempo real) das catepsinas B e K e citocinas pró-inflamatórias (IL- 1β , IL-6 e TNF- α) em células de linhagem macrofágica de camundongos (RAW 264.7), após 12 e 24h de estímulo com *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor. Em estudo in vivo, foi avaliada a ação de diferentes concentrações das fitocistatinas sobre a produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos submetidos à injeção de LPS de *E.coli*. Todos os animais foram submetidos à implementação de cânulas na veia femoral para à injeção de LPS de *E.coli* e na artéria femoral para a extração de sangue em 6 diferentes tempos (de 30 a 180 minutos) após o estímulo com LPS de *E.coli* (IV, 100 U μ g/Kg). A quantificação de TNF- α foi realizada por teste ELISA. Os resultados in vitro demonstraram que a Citrus CPI-2 mostrou uma redução significativa na expressão gênica de catepsinas e citocinas, a Cane CPI-4 não apresentou uma redução dos genes testados. In vivo, a Citrus CPI-2 administrada IP (0,8 mg/kg) mostrou uma inibição da produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos após 60 minutos do estímulo inflamatório, enquanto a Cane CPI-4 não apresentou uma redução significativa na produção de TNF- α . Os resultados sugerem que a nova fitocistatina derivada da laranja tem potencial para aplicação terapêutica coadjuvante no tratamento da doença periodontal e deve ser investigada em estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Citocinas. Catepsinas. Cistatinas.

Da Ponte Leguizamón N. Evaluation of the effect of phytocystatins on the gene expression of cathepsins and proinflammatory cytokines in raw 264.7 of mice and the production of $\text{tnf-}\alpha$ in mouse [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The cysteine proteinases and the cytokines play an important role in the initiation and progression of immune-inflammatory processes such as periodontal disease.

The phytocystatins are cystatins derived from plants and they are natural inhibitors of cysteine proteinases. Among them, the Citrus CPI-2 derived from orange and Cane CPI-4 derived from sugar cane have been investigated. The study of them may lead to new therapies for the control of periodontal disease and other immune inflammatory diseases.

The overall objective of this study was to evaluate the effect of phytocystatins CaneCPI-4 and CitrusCPI-2 on mediators of inflammation. The aim of the in vitro study was to assess the inhibitory activity of phytocystatins on gene expression (RT-PCR) of cathepsins B and K and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6 and TNF- α) in murine macrophage cells (RAW 264.7) after 12 and 24 hours of stimulation with heat-inactivated bacteria *Porphyromonas gingivalis*. The aim of the in vivo study was to assess the inhibitory activity of both phytocystatins in the production of TNF- α by blood cells of rats submitted by an injection of lipopolysaccharide (LPS) of *E.coli*. All animals were subjected to the implementation of cannulas to femoral artery and vein for blood collection at 6 different time points (from 30 to 180 minutes) after LPS stimulus (IV, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Quantification of TNF- α was performed by ELISA.

According to the results of the in vitro study, Citrus CPI-2 showed a significant reduction on the gene expression of cathepsins and cytokines, the Cane CPI-4 did not show a significant reduction on the tested genes. In the in vivo study, CitrusCPI-2 administrated IP (0,8 mg/kg) inhibited the TNF- α production by blood cells of rat 60 minutes after the inflammatory stimulus, the Cane CPI-4 didnot show a significant reduction in TNF- α production. The results suggest that the novel phytocystatin orange-derived has potential for application as adjunctive therapy treatment of periodontal disease and should be investigated in future preclinical studies.

Keywords: Cytokines. Cathepsins. Cystatins.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CTSB-** Catepsina B
- CTSK-** Catepsina K
- CTSL-** Catepsina L
- E.COLI-** Escherichia Coli
- GAPDH-** gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- IL-1 β -** interleucina-1alfa.
- IL-6-** interleucina-6
- IL-8-** interleucina-8
- LPS-** Lipopolissacarídeo
- MMPs-** Metaloproteinases da matriz
- NF-K β -** Fator de transcrição nuclear Kappa β
- P. GINGIVALIS-** Porphyromonas gingivalis
- PBS-** Tampão Fosfato-salino
- RANKL-** Receptor ativador de nf-kB
- SFB-** Soro fetal bovino
- TIMPs-** Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
- TNF- α -** Fator de Necrose Tumoral alfa.
- UFC-** Unidade de formação de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Cisteíno Peptidases	12
2.1.1 Catepsina B	13
2.1.2 Catepsina K	14
2.2 Cistatínas	15
2.3 Citocinas	16
2.4 Doença Periodontal	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Estudo In Vitro	20
4.1.1 Desenho experimental	20
4.1.2 Bactérias e condições de crescimento	21
4.1.3 Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em Tempo Real	21
4.1.4 Teste de viabilidade celular	23
4.1.5 Análise estatística	23
4.2 Estudo In Vivo	24
4.2.1 Desenho experimental	24
4.2.2 Preparação de LPS de <i>E.coli</i>	26
4.2.3 Obtenção do plasma sanguíneo	26
4.2.4 Teste Elisa	26
4.2.5 Análise estatística	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Estudo In Vitro	28
5.1.1 Citotoxicidade das fitocistatínas	28
5.1.2 Expressão gênica	29
5.2 Estudo In Vivo	35
5.2.1 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- α	35
5.2.2 Primeira etapa experimental	36
5.2.3 Segunda etapa experimental	37
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A	48

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica iniciada, principalmente, por bactérias anaeróbicas do biofilme dental e resulta na destruição dos tecidos de suporte dos dentes. Durante a progressão da doença periodontal observa-se um desequilíbrio do processo de saúde-doença entre bactérias periodontopatogênicas e a resposta do hospedeiro frente à agressão¹⁷. Nesta condição, muitas citocinas inflamatórias são liberadas induzindo uma perda tecidual³³. A liberação de toxinas e produtos do metabolismo microbiano estimula monócitos a secretarem mediadores inflamatórios, incluindo interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), prostaglandina E2, tromboxano B2 e colagenase. Diversos estudos demonstraram o papel desses mediadores inflamatórios na patogênese da doença periodontal. O nível de IL-1 β e TNF- α encontra-se elevado em sítios periodontalmente ativos, havendo uma redução após a realização de terapia periodontal¹²⁻⁵⁸, sendo que os altos níveis de IL-1 β estão associados aos sinais clínicos e com a severidade da doença periodontal^{36,58}. A IL-6 também apresenta papel na indução de reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar na doença periodontal^{14,29}.

No processo de destruição do tecido conjuntivo na doença periodontal ocorre a ação de vários tipos de proteinases derivadas do hospedeiro. Estudos clínicos e in vitro têm fornecido evidências de que o processo destrutivo na periodontite é consequência do desequilíbrio da homeostase entre as enzimas degradativas, tais como, as metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs)³⁰. Este desequilíbrio também pode ocorrer na presença de outros tipos de enzimas proteolíticas, como as cisteíno proteases lisossomais, especificamente as catepsinas com os respectivos inibidores, denominados cistatinas³⁷.

As cistatinas são classificadas de acordo com as diferenças estruturais, portanto, espera-se que as diferentes cistatinas apresentem perfis específicos de atividade inibitória contra cisteíno peptidases, o entendimento da participação das cisteíno peptidases na progressão da doença periodontal pode levar a novas terapias para o controle desta doença.

7 CONCLUSÃO

Segundo as hipóteses propostas para este estudo, os dados obtidos no estudo *in vitro* demonstram que a fitocistatina Citrus CPI-2 mostrou-se eficaz na inibição da expressão gênica das moléculas testadas (Catepsina K, Catepsina B, TNF- α e IL-1), a Cane CPI-4 não apresentou uma redução da expressão dos genes avaliados em células macrofágicas de linhagem celular de camundongos, RAW 264.7 após os períodos de estímulo inflamatório.

No estudo *in vivo* a Citrus CPI-2(0,8 mg/kg) administrada via IP e IV mostrou melhor eficácia na inibição da produção de TNF- α por células do plasma sanguíneo em ratos, estimuladas por LPS, enquanto a Cane CPI-4 não apresentou uma inibição significativa.

Sendo assim, os dados obtidos sugerem que a fitocistatina Citrus CPI-2 possui potencial para ser utilizada na modulação da resposta do hospedeiro como terapia auxiliar no tratamento da doença periodontal. Portanto, estudos adicionais são justificados para se comprovar esta aplicação.

REFERÊNCIAS*

1. Abrahamson M. Cystatins – Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *J Braz Assoc Advanc Science*. 1993; 45: 229-304.
2. Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd.ed. San Diego: Elsevier; 2004.
3. Beck G, Bottomley G, Bradshaw D, Brewster M, Broadhurst M, Devos R, et al. (E)-2(R)-[1(S)-(Hydroxycarbamoyl)-4-phenyl-3-butenyl]-2 - isobutyl-2 - (methanesulfonyl)-4-methylvalerohydrazide (Ro 32-7315), a selective and orally active inhibitor of tumor necrosis factor- alpha convertase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302(1): 390-6.
4. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007; 86(6): 529-33.
5. Chen HY, Cox SW, Eley BM. Cathepsin B,2-macroglobulin and cystatin levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(1): 34-41.
6. Conway J, Andrews R, Beaudet B, Bickett D, Boncek V, Brodie T, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α (tnf- α) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of tnf- α -converting enzyme and matrix Metalloproteinases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298(3): 900-8.
7. Cox SW, Eley BM. Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV- like activities in gingival crevicular fluid: a comparison of levels before and after basic periodontal treatment of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(5): 333-9.
8. Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(3): 238-75.
9. Eley BM, Cox SW. Cathepsin B/ L, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV- like activities in gingival crevicular fluid: Correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodont Res*. 1992; 27(1): 62-9.
10. Eley BM, Cox SW. The relationship between gingival crevicular fluid cathepsin B activity and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients: a 2-year longitudinal study. *J Periodont Res*. 1996; 31(6): 381-92.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

11. Fuller K, Lawrence KM, Ross JL, Grabowska UB, ShirooM, Samuelsson B, et al. Cathepsin K inhibitors prevent matrix-derived growth factor degradation by human osteoclasts. *Bone*. 2008; 42(1): 200-11.
12. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000; 71(10): 1535-45.
13. Garg G, Pradeep A, Thorat M. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(11): 997-1074.
14. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*. 1993; 64(10): 980-3.
15. Gianotti A, Rios WM, Soares-Costa A, Nogaroto V, Carmona AK, Oliva ML, et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Protein Expr Purif*. 2006; 47(2): 483-9.
16. Gianotti A, Sommer C, Carmona A, Henrique-Silva F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L human breast cancer cell invasion. *Biol Chem*. 2008; 389(4): 447-53.
17. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(12): 1046-52.
18. Gozzi, P, Pahlman I, Palmer, L, Gronberg A, Persson S. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the immunomodulating agent susalimod and experimentally induced tumor necrosis factor-alpha levels in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 291(1): 199-203.
19. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003; 74(3): 391-401.
20. Hannaford J, Guo H, Chen X. Involvement of cathepsins B and L in inflammation and cholesterol trafficking protein NPC2 secretion in macrophages. *Obesity*. 2013; 21(8): 1586-95.
21. Hao L, Zhu G, Lu Y, Wang M, Jules J, Zhou X, et al. Deficiency of cathepsin K prevents inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis and periodontitis and reveals its shared osteoimmune role. *FEBS Lett*. 2015; 589(12): 1331-9.
22. Hou WS, Brömme D, Zhao Y, Mehler E, Dushey C, Weinstein H, et al. Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J Clin Invest*. 1999; 103(5): 731-8.

23. Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M, et al. Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor- α and interleukin-1. *Arthr Rheum*. 1993; 36(6): 772–80.
24. Ichimaru E, Imura K, Hara Y, Kato Y, Kato I. Cystatin activity in gingival crevicular fluid from periodontal disease patients measured by a new quantitative analysis method. *J Periodont Res*. 1992; 27(2): 119-25.
25. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem*. 1997; 272(2): 1197-202.
26. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Comparative histochemical, biochemical and immunocytochemical studies of cathepsin B in human gingival tissue. *J Periodont Res*. 1994; 29(3): 203–13.
27. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Localization of active and inactive elastase, α -1-proteinase inhibitor, and α -2-macroglobulin in human gingiva. *J Dent Res*. 1995; 74(2): 667-74.
28. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Ultrastructural localisation of cathepsin B in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Histochem J*. 1997; 29(10): 727–34.
29. Krajewski AC, Biessei J, Kunze M, Maersch S, Perabo L, Noack MJ. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS*. 2009; 117(10): 746-54.
30. Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, et al. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol*. 2008; 79(1): 166-73.
31. Lemarie G, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, et al. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol*. 1997; 36(7): 735-43.
32. Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, et al. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 1997; 57(23): 5386-90.
33. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(6): 57-71.
34. Margis R, Reis EM, Villeret V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 359(1): 24-30.
35. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005; 15(11): 599-607.
36. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1990; 25(3): 156-63.

37. Mogi M, Otogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(9): 894-8.
38. Motobu M, Amer S, Koyama Y, Hikosaka K, Sameshima T, Yamada M, et al. Protective effects of sugar cane extract on endotoxic shock in mice. *Phyther Res.* 2006; 20(5): 359-63.
39. Musil D, Zucic D, Engh RA, Mayr I, Huber R, Popovic T et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 1991; 10(9): 2321-30.
40. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 506-11.
41. Neervannan S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(5): 715-31.
42. Novinec M, Lenarcic B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *J Biol Chem.* 2013; 394(9): 1163-79.
43. Nycander M, Estrada S, Mort JS, Abrahamson M, Blork I. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Lett.* 1998; 422(1): 61-4.
44. Okada H, Murakami S. Cytokine express in eeriodontal ealth and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(3): 248-66.
45. Oliva MLV, Carmona AK, Andrade SS, Cotrin SS, Soares-Costa A, Henrique-Silva F. Inhibitory selective of canecystatin: a recombinant cysteine protease inhibitor from sugarcane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320(4): 1082-6.
46. Rawlings ND, Barrett AJ. Families of cysteine proteases. *Methods Enzymol.* 1994; 244: 461-86.
47. Reis EM, Margis R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analyses. *Gen Mol Biol.* 2001; 24(1-4): 291-6.
48. Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 1997; 76(12): 1833-9.
49. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1999; 287(1): 103-15.
50. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(3): 206-14.

51. Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 296(5): 1194-9.
52. Tezuka K, Tekuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, et al. Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem.* 1994; 269(2): 1106-9.
53. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 1991; 285(2): 213-9.
54. Turner P, Brabb T, Pekow C, Vasbinder M. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011; 50(5): 600–13.
55. Valeeva TA, Mosolov VV. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry.* 2004; 69(11): 1305-9.
56. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(4): 387-403.
57. Wang Q, Zhang Y, Hall J, Lin L, Raut U, Mollova N, et al. A rat pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 56(1): 67-71.
58. Yucel O, Berker E, Mesci L, Eratalay K, Tepe E, Tezcan I. Analysis of TNF-a (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF-a levels in aggressive and chronic periodontitis: a preliminary report. *Cytokine.* 2015; 72(2): 173–7.
59. Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(4): 285-93.