

RESSALVA

Atendendo solicitação do autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 31/10/2027.



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



Luana Raphael da Silva

**Cistatina da Maquiberry inibe atividade da catepsina k e estimula a
diferenciação osteogênica de células pulpares humanas**

Araraquara

2025



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



Luana Raphael da Silva

**Cistatina da Maquiberry inibe atividade da catepsina k e estimula a
diferenciação osteogênica de células pulpaes humanas**

Tese apresentada à Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia,
Araraquara para obtenção do título de Doutor
em Odontologia, na Área de Endodontia

Orientadora: Gisele Faria

Araraquara

2025

S586c Silva, Luana Raphael da
Cistatina da Maquiberry inibe atividade da catepsina K e estimula a diferenciação osteogênica de células pulpares humanas / Luana Raphael da Silva. -- Araraquara, 2025
50 p. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Gisele Faria

1. Polpa dentária. 2. Catepsinas. 3. Cistatinas. I. Título.

Luana Raphael da Silva

**Cistatina da Maquiberry inibe atividade da catepsina k e estimula a
diferenciação osteogênica de células pulpares humanas**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

2º Examinadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

3º Examinador: Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

4º Examinadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira Valarelli

Araraquara, 31 de outubro de 2025.

DADOS CURRICULARES

Luana Raphael da Silva

NASCIMENTO: 02/10/1996 – São Joaquim da Barra – São Paulo

FILIAÇÃO: Devair Raphael da Silva
Elisa Regina Oliveira da Silva

2015 – 2018 Graduação em Odontologia no Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB), Barretos, SP – Brasil

2018 – 2018 Curso de Atualização em Endodontia, na Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas Regional de Barretos (APCD), Barretos, SP – Brasil

Curso de Atualização de Inter-Relação Perio, Dentística e Prótese, no Centro Universitária do Norte Paulista, UNIPÓS-UNORP, São José do Rio Preto, SP – Brasil

2020 – 2022 Especialização em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP

2020 – 2022 Pós-graduação em Odontologia, Área de Endodontia, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP

2024 – 2025 Especialização em Radiologia e Imaginologia Odontológica na Faculdade do Centro Oeste Paulista – FACOP

2022 – 2025 Pós-graduação em Odontologia, Área de Endodontia, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

*Dedico a Deus, por tornar possível a realização deste sonho
e por me sustentar em todos os momentos da minha vida*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo cuidado constante, por se manifestar em cada detalhe da minha vida e por me conceder forças e coragem para vencer este desafio, pois nada acontece por acaso e tudo tem um propósito maior.

Aos meus pais, Devair Raphael da Silva e Elisa Regina Oliveira da Silva, pelo apoio e carinho que sempre me dedicaram. Sou profundamente grata por ser filha de vocês e carrego comigo todos os seus ensinamentos. Amo muito vocês e reconheço que tudo o que sou devo a vocês dois. Agradeço por cada gesto de amor, por cada palavra de incentivo e por todos os sacrifícios feitos para que eu chegasse até aqui. Vocês me ensinaram o valor da honestidade, da humildade, da fé e do trabalho, e é com esses princípios que construo minha trajetória. Tenho em vocês não apenas pais, mas exemplos de vida, inspiração e orgulho.

À minha irmã Aline, pela presença constante em minha vida e pelos conselhos de sabedoria. O caminho até aqui foi árduo, mas sempre tive ao meu lado sua orientação de irmã mais velha, que me guiou com carinho, força e confiança. Sou profundamente grata por cada palavra de incentivo, por cada gesto de cuidado e por dividir comigo não apenas os desafios, mas também as alegrias desta caminhada.

À Waleska Brigo de Souza, quero te agradecer por ter estado ao meu lado em todos os momentos, pelo companheirismo, paciência e força que me deu nos dias difíceis. Sua presença sempre foi meu apoio e meu conforto, e sou muito grata por isso.

À Cida, Eunice, Elias e Antônio, essas quatro pessoas queridas, que estiveram comigo de forma que as palavras não explicam, mas que o coração reconhece. Obrigada pelo apoio e conforto de uma palavra quando eu mais precisei.

À minha orientadora Profa. Dra. Gisele Faria, pela orientação, profissionalismo e generosidade em dedicar seu tempo para me ensinar.

Aos professores Mário Tanomaru Filho, Juliane Tanomaru, Fábio Berbert e Renato de Toledo Leonardo, sou profundamente grata por ter tido a oportunidade de aprender com grandes mestres, que me orientaram, apoiaram e inspiraram ao longo destes anos.

Às professoras Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga e Fernanda Gonçalves Basso Lombardi, pela disponibilidade e valiosa contribuição como integrantes da banca de qualificação deste trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação, pelo companheirismo, apoio e incentivo durante toda a trajetória. Obrigada por tornarem esta jornada mais leve, divertida e inspiradora, compartilhando desafios, conquistas e momentos inesquecíveis.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2022/07823-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Silva LR. Cistatina da Maquiberry inibe atividade da catepsina K e estimula a diferenciação osteogênica de células pulpares humanas [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

Cistatinas são inibidores endógenos de cisteíno proteases que exercem controle da degradação proteolítica da matriz extracelular. Fitocistatinas, por sua vez, correspondem às cistatinas de origem vegetal, e algumas já foram obtidas por meio de expressão recombinante, como a MaquiCPI-3, isolada da planta *Aristotelia chilensis* ou maqui, cujo fruto é denominado maquiberry. Tanto os frutos quanto as folhas são tradicionalmente utilizadas na terapêutica popular, fundamentado em suas propriedades bioativas, como as ações anti-inflamatória e antioxidante. O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da MaquiCPI-3 em inibir a atividade da cisteíno protease catepsina K (CatK) humana, bem como investigar sua citotoxicidade, seu efeito sobre a proliferação e diferenciação osteo/odontogênica, além de seu potencial quimiotático em células da polpa dental humana (hDPCs). A atividade inibitória da MaquiCPI-3 contra a CatK foi medida em espectrofluorímetro, utilizando o substrato fluorogênico Z-PheArg-AMC. As hDPCs, obtidas de três doadores, foram caracterizadas por citometria de fluxo quanto à expressão dos marcadores CD90, CD73 e CD105 (associados a células-tronco mesenquimais) e CD34 e CD45 (relacionados a células hematopoiéticas). Após a caracterização, células tratadas com MaquiCPI-3 e células controle (não tratadas) foram avaliadas quanto à viabilidade celular, por meio do ensaio de metil-tiazol-tetrazólio (MTT); quimiotaxia, por meio do ensaio de migração celular em câmara de Transwell; proliferação celular, por meio do ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU); atividade de fosfatase alcalina, pela liberação de timolftaleína; e à expressão gênica de marcadores relacionados à diferenciação osteogênica e odontogênica, avaliada por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR). Os dados foram analisados utilizando ANOVA seguida dos pós-testes de Tukey ou Dunnett, conforme apropriado, e os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn para dados com distribuição não normal ($\alpha = 0,05$). A MaquiCPI-3 apresentou elevado potencial de inibição da enzima CatK, com K_i de 1,72 nM, e não demonstrou citotoxicidade para hDPCs. Embora não tenha estimulado a proliferação de hDPCs nem exibido efeito quimiotático ($p > 0,05$), promoveu aumento significativo na formação de nódulos mineralizados e na atividade da fosfatase alcalina em comparação ao controle ($p < 0,05$). Além disso, induziu maior expressão dos marcadores osteogênicos BMP-2 e osteocalcina (OC), em relação ao controle ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve indução da expressão de RUNX2, COL1A1, ALP e BSP. Quanto aos marcadores dentinogênicos DMP-1 e DSPP, não foram detectados transcritos. Conclui-se que embora a MaquiCPI-3 não tenha estimulado a proliferação e migração, sua capacidade de inibir a catepsina K e induzir o fenótipo osteogênico demonstra potencial promissor para aplicação em estratégias terapêuticas voltadas ao reparo e regeneração dos tecidos pulpar e periapical, bem como ao controle da reabsorção óssea.

Palavras – chave: Polpa dentária; Catepsinas; Cistatinas.

Silva LR. Maquiberry cystatin inhibits cathepsin K activity and stimulates osteogenic differentiation of human pulp cells [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

Cystatins are endogenous inhibitors of cysteine proteases that regulate the proteolytic degradation of the extracellular matrix. Phytocystatins, in turn, are plant-derived cystatins, and some have already been obtained through recombinant expression, such as MaquiCPI-3, isolated from the plant *Aristotelia chilensis* (maqui), whose fruit is known as maqui berry. Both fruits and leaves are traditionally used in folk medicine, owing to their bioactive properties, including anti-inflammatory and antioxidant activities. This study aimed to evaluate the ability of MaquiCPI-3 to inhibit the activity of the human cysteine protease cathepsin K (CatK), as well as to investigate its cytotoxicity, effects on proliferation and osteo/odontogenic differentiation, and its chemotactic potential in human dental pulp cells (hDPCs). The inhibitory activity of MaquiCPI-3 against CatK was measured using a spectrofluorometer with the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC. hDPCs, obtained from three donors, were characterized by flow cytometry for the expression of CD90, CD73, and CD105 (mesenchymal stem cell markers) and CD34 and CD45 (hematopoietic cell markers). After characterization, MaquiCPI-3-treated cells and untreated control cells were assessed for cell viability using the methylthiazol-tetrazolium (MTT) assay; chemotaxis, through the Transwell migration assay; cell proliferation, via the bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay; alkaline phosphatase (ALP) activity, by thymolphthalein release; and the gene expression of osteogenic and odontogenic markers, evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's post hoc tests, as appropriate, and the Kruskal-Wallis and Dunn's nonparametric tests for non-normally distributed data ($\alpha = 0.05$). MaquiCPI-3 showed high inhibitory potential against CatK, with a K_i of 1.72 nM, and exhibited no cytotoxicity toward hDPCs. Although it did not stimulate hDPC proliferation or show chemotactic effects ($p > 0.05$), it significantly increased mineralized nodule formation and alkaline phosphatase activity compared to the control ($p < 0.05$). Moreover, it induced higher expression of the osteogenic markers BMP-2 and osteocalcin (OC) relative to the control ($p < 0.05$). Conversely, it did not induce the expression of RUNX2, COL1A1, ALP, or BSP. Regarding the dentinogenic markers DMP-1 and DSPP, no transcripts were detected. In conclusion, although MaquiCPI-3 did not stimulate proliferation or migration, its ability to inhibit CatK and induce the osteogenic phenotype demonstrates promising potential for therapeutic strategies targeting pulp and periapical tissue repair and regeneration, as well as the control of bone resorption.

Keywords: Dental pulp; Cathepsins; Cystatins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
4 MATERIAL E MÉTODO	23
4.1 Expressão e purificação da proteína recombinante	
MaquiCPI-3	23
4.2 Inibição da atividade da catepsina k humana	23
4.3 Obtenção das culturas de células	24
4.4 Caracterização imunofenotípica da cultura de hDPCs	24
4.5 Viabilidade/metabolismo celular por ensaio de MTT	25
4.6 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)	25
4.7 Coloração com vermelho de alizarina (ARS)	26
4.8 RT-qPCR	26
4.9 Proliferação celular	27
4.10 Quimiotaxia	28
4.11 Análise estatística	28
5 RESULTADO	29
5.1 Inibição da atividade da catepsina K humana	29
5.2 Caracterização imunofenotípica da cultura de hDPCs	29
5.3 Viabilidade/metabolismo celular por ensaio de MTT	30
5.4 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)	31
5.5 Coloração com vermelho de alizarina (ARS)	32
5.6 RT-qPCR.....	33
5.7 Proliferação celular	34
5.8 Quimiotaxia.....	34
6 DISCUSSÃO	36

7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A	50

1 INTRODUÇÃO

Em condições fisiológicas normais, o processo de remodelação óssea é regulado pela ação coordenada dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, e dos osteoblastos, encarregados de sua formação, assegurando a integridade estrutural e a manutenção da homeostase^{1,2}. No entanto, o desequilíbrio desse mecanismo, com predominância da atividade osteoclástica, pode resultar no desenvolvimento de distúrbios como osteoporose, artrite, doença periodontal e periodontite apical³⁻⁵.

Os osteoclastos apresentam a zona de selamento, responsável por sua firme adesão à superfície óssea, e a borda ondulada, onde ocorre a solubilização da matriz mineral por meio da acidificação local⁶. Após essa etapa, a matriz orgânica, composta predominantemente por colágeno tipo I, é degradada por enzimas proteolíticas. Dentre elas, destacam-se as metaloproteinases da matriz (MMPs), que atuam na remoção e remodelação dos componentes orgânicos, e as cisteíno proteases, como a catepsina K (CatK), com papel chave na degradação do colágeno^{7,8}.

As cisteíno proteases são expressas em todos os organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, plantas e animais e está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos e patogênicos⁹. Dentre as cisteíno proteases de humanos, a CatK é a principal protease lisossomal expressa em altos níveis pelos osteoclastos¹⁰, sendo fundamental no processo de reabsorção óssea¹¹. Ela está envolvida na degradação do colágeno tipo I, principal componente da matriz óssea orgânica, e do colágeno tipo II^{12,13}, promovendo degradação tecidual¹⁴. Além disso, a CatK participa da indução da diferenciação de osteoclastos^{15,16} e atua na regulação de sua função, assim como na dos macrófagos¹⁷.

No contexto da periodontite apical, a CatK está diretamente relacionada ao desenvolvimento da lesão periapical^{18,19}, com aumento de sua expressão na presença de inflamação periapical²⁰. O silenciamento do gene da CatK reduziu a reabsorção óssea e a expressão de citocinas inflamatórias em modelos de lesões periapicais em ratos²¹. O uso de inibidores sintéticos da CatK também mostrou efeitos benéficos, como a redução da expansão das lesões, do número de macrófagos e osteoclastos, e da produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos de periodontite apical^{22,23}. Além disso, o desequilíbrio da CatK com aumento de sua expressão também tem sido associado a diversas doenças, como osteoporose, osteoartrite, doenças

cardiovasculares, doenças neurológicas, câncer, doença periodontal, entre outras^{3,24-27}. Estudos com depleção genética da CatK evidenciaram redução significativa da inflamação e da perda óssea em modelos de artrite reumatoide e doença periodontal, com diminuição de osteoclastos, macrófagos, células dendríticas e células T²⁸.

Diante disso, a CatK tem sido considerada um alvo terapêutico promissor. Os inibidores de CatK representam uma estratégia terapêutica não apenas para doenças musculoesqueléticas, como osteoporose e osteoartrite²⁷, mas também para periodontite apical e doença periodontal^{29,30}. Medicamentos sintéticos, desenvolvidos para bloquear seletivamente a CatK estão sendo cada vez mais estudados³¹. No entanto, apesar dos avanços, até o momento nenhum inibidor de CatK foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico, e poucos permanecem em investigação^{32,33}.

Os principais desafios no desenvolvimento de inibidores da CatK envolvem o equilíbrio entre eficácia e segurança³⁴. Diversos fármacos mostraram resultados promissores, mas foram descontinuados devido a efeitos adversos. Odanacatib (Merck) aumentou a densidade mineral óssea e reduziu fraturas, mas foi associado a um maior risco de acidente vascular cerebral^{35,36}. Balicatib (Novartis) também melhorou a densidade óssea, porém causou espessamento cutâneo semelhante à morfeia³⁷. ONO-5334 (Ono Pharmaceutical) apresentou bons resultados iniciais, mas levou ao aumento do número de osteoclastos e alterações funcionais após a interrupção do tratamento³⁸.

Além dos inibidores sintéticos, inibidores endógenos como as cistatinas, proteínas que atuam como inibidores reversíveis das cisteíno proteases, também têm sido estudados³⁹. Essas proteínas são classificadas em quatro famílias: três com origem animal e uma de origem vegetal, conhecidas como fitocistatinas⁴⁰. As fitocistatinas são inibidoras naturais de cisteíno proteases de plantas⁴¹. Algumas fitocistatinas produzidas de forma recombinante, como a Csin-CPI-2 derivada de *Citrus sinensis* ou laranja doce, e as canacistatinas derivadas da cana-de-açúcar, inibem a atividade enzimática das catepsinas humanas, incluindo a catepsina K^{42,41}. Adicionalmente, a Csin-CPI-2 reduziu a inflamação, a perda óssea alveolar em periodontite induzida por ligadura em camundongos, bem como a osteoclastogênese⁴³.

Além de atuarem como inibidores das catepsinas, apresentarem atividade anti-inflamatória e reduzirem a osteoclastogênese, estudos mostram que as fitocistatinas

também podem exercer efeitos pró-osteogênicos. A *CsinCPI-2* promoveu efeito pró-osteogênico in vitro em células da polpa dentária humana (hDPCs), com aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), formação de nódulos mineralizados e elevação da expressão gênica de marcadores osteogênicos, como BMP-2, RUNX2, ALP, osteocalcina e sialoproteína óssea (BSP)⁴². De forma semelhante, a cistatina derivada da cana-de-açúcar (*CaneCPI-1*) induziu a diferenciação osteogênica em hDPCs⁴⁴. A *CaneCPI-5* também induziu expressão de biomarcadores clássicos do fenótipo osteogênico, como BMP-2, Osterix e ALP em pré-osteoblastos MC3T3-E1⁴⁵. Além das fitocistatinas, resultados semelhantes foram observados com o uso da cistatina C (CysC; BioVender Laboratory Medicine, Brno, Czech Republic) em células da medula óssea e da calvária de camundongos, que apresentaram aumento da expressão de BMP-2 e RUNX2, além da elevação da atividade da ALP, da mineralização da matriz e da formação óssea na calvária⁴⁶. Os estudos com as referidas fitocistatinas evidenciam o seu potencial promissor para aplicações no reparo do tecido pulpar e periapical, bem como em procedimentos endodônticos regenerativos.

Mais recentemente, foram desenvolvidas e produzidas de forma recombinante cistatinas derivadas da maqui⁴⁷. A maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz), também conhecida como macqui, clon, maquie, queldron ou koelon, é uma planta pertencente à família Elaeocarpaceae, nativa da América do Sul, especialmente da região da Patagônia, no Chile e na Argentina. Essa espécie produz pequenos frutos de coloração roxa intensa, chamados maquiberries, amplamente consumidos in natura ou utilizados na preparação de geleias, sucos, vinhos, chás e outros produtos alimentícios^{48,49}.

Tanto os frutos quanto as folhas da maqui possuem efeito anti-inflamatório e são tradicionalmente empregados na medicina popular sul-americana para o tratamento de diversas condições, como dores de garganta, enfermidades renais e digestivas, febres e cicatrização de feridas^{50,49}. A maqui vem se destacando por apresentar fitoquímicos em grandes quantidades, principalmente as antocianinas⁴⁹. As antocianinas conferem a ela propriedades antioxidativa⁵¹, anti-inflamatória^{50,51}, cardioprotetiva⁵², antiaterogênica, antidiabética, entre outras^{49,51}. Essas propriedades mostram o potencial da maqui como fonte de compostos bioativos com aplicações na saúde humana.

Recentemente o grupo do Prof. Flávio Henrique Silva (Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução) construiu transcriptoma da maqui

usando *next-generation sequencing*, e encontraram seis cistatinas recombinantes derivadas da Maqui: MaquiCPI-1, MaquiCPI-2, MaquiCPI-3, MaquiCPI-4, MaquiCPI-5 e MaquiCPI-6⁴⁷. Cinco delas foram clonadas, expressas de forma recombinante e mostraram inibição contra papaína e catepsinas B e L humanas. Isso sugere o uso potencial das maquicistatinas no tratamento de doenças humanas⁴⁷. Das cinco maquicistatinas, a MaquiCPI-3, apresentou o maior rendimento de produção (mais de 100 mg por litro de cultura de *E. coli*⁴⁷ e por isso foi escolhida como alvo deste estudo.

Embora a MaquiCPI-3 tenha demonstrado capacidade de inibir a papaína e as catepsinas humanas B e L, sua ação inibitória sobre a CatK, enzima que desempenha papel central nos processos de reabsorção óssea⁵³, inclusive na patogênese da periodontite apical²¹, ainda não foi investigada. No entanto, a relevância da MaquiCPI-3 na Odontologia tem sido evidenciada por estudos que demonstraram seu efeito protetor promissor contra o estágio inicial da erosão dentária *in vitro*, destacando seu potencial para futuras aplicações em produtos voltados à proteção do esmalte e da dentina^{47,54}.

A endodontia regenerativa baseia-se em princípios biológicos para restaurar o complexo dentino-pulpar e os tecidos periapicais, empregando substâncias capazes de estimular células-tronco mesenquimais a se diferenciar em células produtoras dos tecidos comprometidos⁵⁵. A busca por substâncias bioativas que induzem a diferenciação osteoblástica e/ou odontoblástica de células-tronco mesenquimais constitui um dos principais desafios no desenvolvimento de abordagens terapêuticas voltadas à reparação pulpar, periapical e à regeneração endodôntica⁵⁶.

Considerando o potencial osteoindutor já demonstrado por fitocistatinas em diferentes modelos^{42,57,43,45}, bem como a sua capacidade de inibir a CatK^{58,42}, o presente estudo investiga a MaquiCPI-3 como uma candidata promissora para aplicações em reparação e regeneração tecidual. Para isso, são analisadas suas interações com células da polpa dentária humana (hDPCs), com foco na biocompatibilidade e nos processos celulares relacionados à regeneração/reparação. A hipótese é que a MaquiCPI-3 é capaz de inibir a CatK e de modular positivamente a viabilidade, migração, proliferação e diferenciação osteo/odontogênica dessas células.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a MaquiCPI-3 inibiu a atividade da CTSK humana, não apresentou citotoxicidade e induziu a diferenciação osteogênica de hDPCs. Embora não tenha estimulado a proliferação ou migração celular, sua capacidade de induzir fenótipo osteogênico e inibir a CTSK demonstra potencial promissor para sua aplicação em estratégias terapêuticas voltadas ao reparo pulpar e periapical, bem como controle da reabsorção óssea.

REFERÊNCIAS*

1. Raut N, Wicks SM, Lawal TO, Mahady GB. Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds. *Pharmacol Res.* 2019; 147: 104350.
2. Hu W, Deng J, Su Z, Wang H, Lin S. Advances on T cell immunity in bone remodeling and bone regeneration. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2024; 53(4): 450-9.
3. Wen X, Yi LZ, Liu F, Wei JH, Xue Y. The role of cathepsin K in oral and maxillofacial disorders. *Oral Dis.* 2016; 22(2): 109-15.
4. Luo X, Wan Q, Cheng L, Xu R. Mechanisms of bone remodeling and therapeutic strategies in chronic apical periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12: 908859.
5. Yu B, Wang CY. Osteoporosis and periodontal diseases - An update on their association and mechanistic links. *Periodontol 2000.* 2022; 89(1): 99-113.
6. Everts V, Jansen IDC, de Vries TJ. Mechanisms of bone resorption. *Bone.* 2022; 163: 116499.
7. Schurigt U, Hummel KM, Petrow PK, Gajda M, Stöckigt R, Middel P et al. Cathepsin K deficiency partially inhibits, but does not prevent, bone destruction in human tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(4): 950-9.
8. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2017; 26(6): e12741.
9. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A et al. Microbial proteases applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 110.
10. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocr Rev.* 2017; 38(4): 325-50.
11. Janiszewski T, Kolt S, Ciaston I, Vizovisek M, Poręba M, Turk B, et al. Investigation of osteoclast cathepsin K activity in osteoclastogenesis and bone loss using a set of chemical reagents. *Cell Chem Biol.* 2023; 30(2): 159-174.e8.
12. Aguda AH, Panwar P, Du X, Nguyen NT, Brayer GD, Brömme D. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(49): 17474-9.
13. Mort JS, Beaudry F, Thérout K, Emmott AA, Richard H, Fisher WD, et al. Early cathepsin K degradation of type II collagen in vitro and in vivo in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016; 24(8): 1461-9.
14. Lu J, Wang M, Wang Z, Fu Z, Lu A, Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018; 33(1): 890-904.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1824(1): 68-88.
16. Li H, Zheng F, Tao A, Wu T, Zhan X, Tang H, et al. LncRNA H19 promotes osteoclast differentiation by sponging miR-29c-3p to increase expression of cathepsin K. *Bone*. 2025; 192: 117340.
17. Zhao K, Sun Y, Zhong S, Luo JL. The multifaceted roles of cathepsins in immune and inflammatory responses: implications for cancer therapy, autoimmune diseases, and infectious diseases. *Biomark Res*. 2024; 12(1): 165.
18. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod*. 2010; 36(2): 244-50.
19. Hao L, Chen J, Zhu Z, Reddy MS, Mountz JD, Chen W, et al. Odanacatib, a cathepsin K-specific inhibitor, inhibits inflammation and bone loss caused by periodontal diseases. *J Periodontol*. 2015; 86(8): 972-83.
20. Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, et al. Ovariectomy exacerbates apical periodontitis in rats with an increase in expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Endod*. 2018; 44(5): 780-5.
21. Gao B, Chen W, Hao L, Zhu G, Feng S, Ci H, et al. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. *J Dent Res*. 2013; 92(2): 180-6.
22. Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, et al. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun*. 2015; 83(4): 1235-45.
23. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K inhibitor regulates inflammation and bone destruction in experimentally induced rat periapical lesions. *J Endod*. 2015; 41(9): 1474-9.
24. Kramer L, Turk D, Turk B. The future of cysteine cathepsins in disease management. *Trends Pharmacol Sci*. 2017; 38(10): 873-98.
25. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. *Cells*. 2019; 8(3): 264.
26. Heo SC, Kim YN, Choi Y, Joo JY, Hwang JJ, Bae MK, et al. Elevated expression of cathepsin K in periodontal ligament fibroblast by inflammatory cytokines accelerates osteoclastogenesis via paracrine mechanism in periodontal disease. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(2): 695.
27. Mijanović O, Jakovleva A, Branković A, Zdravkova K, Pualic M, Belozerskaya TA, et al. Cathepsin K in pathological conditions and new therapeutic and diagnostic perspectives. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(22): 13762.
28. 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.

29. Arias Z, Nizami MZI, Chen X, Chai X, Xu B, Kuang C, et al. Recent advances in apical periodontitis treatment: a narrative review. *Bioengineering (Basel)*. 2023; 10(4): 488.
30. Zhou H, Zhang YF, Zhang QQ, Liu F, Zhang JY, Chen Y. Cathepsin K inhibition alleviates periodontal bone resorption by promoting type H vessel formation through PDGF-BB/PDGFR- β axis. *Oral Dis*. 2024; 30(8): 5335-48.
31. Brizuela L, Buchet R, Bougault C, Mebarek S. Cathepsin K inhibitors as potential drugs for the treatment of osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(7): 2896.
32. Hasegawa C, Kastrissios H, Monteleone J, Ohno T, Umemura T, Ohyama M, et al. Modeling and simulation of bone mineral density response from a phase 2 study of ONO-5334, a new cathepsin K inhibitor, to support dose selection in osteoporosis. *J Clin Pharmacol*. 2014; 54(8): 937–48.
33. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, et al. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Jun 4; 8: 433.
34. Moon DO. Review of cathepsin K inhibitor development and the potential role of phytochemicals. *Molecules*. 2024; 30(1): 91.
35. Feng S, Luo Z, Liu D. Efficacy and safety of odanacatib treatment for patients with osteoporosis: a meta-analysis. *J Bone Miner Metab*. 2015; 33(4) :448–54.
36. Rodríguez AJ, Abrahamsen B. Cardiovascular safety of antifracture medications in patients With osteoporosis: A narrative review of evidence from randomized studies. *JBMR Plus*. 2021; 5(7): e10522.
37. Russell RG. Pharmacological diversity among drugs that inhibit bone resorption. *Curr Opin Pharmacol*. 2015; 22: 115-30.
38. Stone JA, McCrea JB, Witter R, Zajic S, Stoch SA. Clinical and translational pharmacology of the cathepsin K inhibitor odanacatib studied for osteoporosis. *Br J Clin Pharmacol*. 2019; 85(6): 1072–83.
39. Stańczykiewicz B, Łuc M, Banach M, Zabłocka A. Cystatins: unravelling the biological implications for neuroprotection. *Arch Med Sci*. 2023; 20(1): 157–66.
40. Margis R, Reis EM, Villeret V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Nov 1; 359(1): 24-30.
41. Shibao PYT, Santos-Júnior CD, Santiago AC, Mohan C, Miguel MC, Toyama D, et al. Sugarcane cystatins: from discovery to biotechnological applications. *Int J Biol Macromol*. 2021; 167: 676–86.
42. Leguizamón NDP, Rodrigues EM, de Campos ML, Nogueira AVB, Viola KS, Schneider VK, et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory and pro-osteogenic effects of citrus cystatin CsinCPI-2. *Cytokine*. 2019; 123: 154760.
43. Da Ponte Leguizamón N, de Molon RS, Coletto-Nunes G, Nogueira AVB, Rocha SV, Neo-Justino DM, et al. Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *J Dent Res*. 2022; 101(2): 216-225.

44. Rodrigues EM, Viola KS, Gomes-Cornélio AL, Soares-Costa A, Henrique-Silva F, Rossa-Junior C, et al. Sugarcane cystatin CaneCPI-1 promotes osteogenic differentiation in human dental pulp cells: a new insight into cysteine proteases inhibitors. *Int Endod J*. 2020; 53(11): 1485-93.
45. Fernandes CJDC, Ferreira BA, Oliveira FL, Toyama MH, Araújo FA. Recombinant sugarcane cystatin CaneCPI-5 promotes osteogenic differentiation. *Tissue Cell*. 2023; 83: 102157.
46. Danjo A, Yamaza T, Kido MA, Shimohira D, Tsukuba T, Kagiya T, et al. Cystatin C stimulates the differentiation of mouse osteoblastic cells and bone formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360(1): 199-204.
47. De Souza EP, Silva PF, Lopes BC, Almeida DA, Cury JA, Camargo SEA, et al. Maquiberry cystatins: recombinant expression, characterization, and use to protect tooth dentin and enamel. *Biomedicines*. 2023; 11(5): 1360.
48. Rodríguez K, Ah-Hen K, Vega-Gálvez A, Vasquez V, Quispe I, Rojas P, et al. Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT Food Sci Technol*. 2016; 65: 537-42.
49. Martchenko A, Papaelias A, Bolz SS. Physiologic effects of the maqui berry (*Aristotelia chilensis*): a focus on metabolic homeostasis. *Food Funct*. 2024; 15(9): 4724–40.
50. Quispe-Fuentes I; Vega-Gálvez A, Aranda M, Poblete J, Pasten A, Bilbao-Sainz C, et al. Effects of drying processes on composition, microstructure and health aspects from maqui berries. *J Food Sci Technol*. 2020; 57(6): 2241-50.
51. Tiscornia C, Tapia V, Aguila D, Lorca-Ponce E, Aicardi V, Vasquez F. Maqui and Chronic Kidney Disease: A Narrative Review on the Potential Nephroprotective Role of Anthocyanins. *Nutrients*. 2025; 17(6): 1058.
52. Céspedes CL, El-Hafidi M, Pavon N, Alarcón J. Atividades antioxidantes e cardioprotetoras de extratos fenólicos de frutos de amora-preta chilena *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Quim Aliment*. 2008; 107: 820-9.
53. Panwar P, Olesen JB, Blum G, Delaisse JM, Søre K, Brömme D. Real-time analysis of osteoclast resorption and fusion dynamics in response to bone resorption inhibitors. *Sci Rep*. 2024; 14(1): 7358.
54. Pelá VT, Silva TL, Taira EA, Sant'ana GA, Sakae LO, Levy FM, et al. Synergistic effect of Maquiberry cystatin, sodium fluoride and stannous chloride for the prevention of initial dental erosion in vitro. *J Appl Oral Sci*. 2025; 33: e20240479.
55. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007; 33(4): 377-90.
56. Sultan NA, Hamama HH, Grawish ME, El-Toukhy RI, Mahmoud SH. Impact of different capping materials extracts on proliferation and osteogenic differentiation of cultured human dental pulp stem cells. *Sci Rep*. 2025; 15(1): 11140.

57. da Costa Fernandes C Jr, Rodríguez VMO, Soares-Costa A, Cirelli JA, Justino DMN, Roma B, et al. Cystatin-like protein of sweet orange (CsinCPI-2) modulates pre-osteoblast differentiation via β -Catenin involvement. *J Mater Sci Mater Med*. 2021; 32(4): 33.
58. Santiago AC, Khan ZN, Miguel MC, Gironda CC, Soares-Costa A, Pelá VT, et al. A new sugarcane cystatin strongly binds to dental enamel and reduces erosion. *J Dent Res*. 2017; 96(9): 1051-7.
59. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423(6937): 337-42.
60. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res*. 2022; 10(1): 48.
61. Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB, et al. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res*. 2006; 21(9): 1399-408.
62. Akisaka T, Yoshida A. Ultrastructural analysis of apatite-degrading capability of extended invasive podosomes in resorbing osteoclasts. *Micron*. 2016; 88: 37-47.
63. Montaseri A, Giampietri C, Rossi M, Riccioli A, Del Fattore A, Filippini A. The role of autophagy in osteoclast differentiation and bone resorption function. *Biomolecules*. 2020; 10(10): 1398.
64. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; 4(6): 2302-21.
65. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*. 2002; 30(4): 533-40.
66. Shorey S, Heersche JN, Manolson MF. The relative contribution of cysteine proteinases and matrix metalloproteinases to the resorption process in osteoclasts derived from long bone and scapula. *Bone*. 2004; 35(4): 909-17.
67. Uemura T, Liu YK, Kuboki Y. Preliminary communication. mRNA expression of MT1-MMP, MMP-9, cathepsin K, and TRAP in highly enriched osteoclasts cultured on several matrix proteins and ivory surfaces. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000; 64(8): 1771-3.
68. Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I, et al. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone*. 2004; 34(1): 37-47.
69. Guay J, Falgout JP, Ducret A, Percival MD, Mancini JA. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem*. 2000; 267(20): 6311-8.
70. Billington CJ, Mason P, Magny MC, Mort JS. The slow-binding inhibition of cathepsin K by its propeptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276(3): 924-9.

71. Dodds RA. A cytochemical assay for osteoclast cathepsin K activity. *Cell Biochem Funct.* 2003; 21(3): 231-4.
72. Bühling B, Röcken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, et al. Papel fundamental da catepsina K na fibrose pulmonar. *Sou J Pathol.* 2004; 164(6): 2203-16.
73. Dejica VM, Mort JS, Lavery S, Antoniou J, Zukor DJ, Tanzer M, et al. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(3): R113.
74. Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res Notes.* 2015; 8: 322.
75. Rossi A, Riccio R, Dragani LK, Montinaro V, Rinaldi M, Mazzanti L, et al. Identification and characterization of human cathepsins. *Biochem J.* 2004; 382(Pt 2): 387-97.
76. Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. Cathepsins: regulating cellular functions in health and disease. *Cells.* 2020; 9(5): 1133.
77. Bright NA, Davis LJ, Luzio JP. Endolysosomes are the principal intracellular sites of acid hydrolase activity. *Curr. Biol.* 2016; 26(17): 2233-45.
78. Ward C, Martinez-Lopez N, Otten EG, Carroll B, Maetzel D, Singh R, Sarkar S, Korolchuk VI. Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1861(4): 269-84.
79. Pečar Fonović U, Kos J, Mitrović A. Compensational role between cathepsins. *Biochimie.* 2024; 226: 62-76.
80. Cermak S, Kosicek M, Mladenovic-Djordjevic A, Smiljanic K, Kanazir S, Hecimovic S. Loss of Cathepsin B and L Leads to Lysosomal Dysfunction, NPC-Like Cholesterol Sequestration and Accumulation of the Key Alzheimer's Proteins. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0167428.
81. Kumar A, Dhar S, Campanelli G, Butt NA, Schallheim JM, Gomez CR, et al. MTA1 drives malignant progression and bone metastasis in prostate cancer. *Mol Oncol.* 2018; 12(9): 1596-1607.
82. Xie H, Chen G, Young RN. Design, Synthesis, and Pharmacokinetics of a Bone-Targeting Dual-Action Prodrug for the Treatment of Osteoporosis. *J Med Chem.* 2017; 60(16): 7012-28.
83. Zhang H, Zhang J, Ma X, Huang X, Zhu D, Wang T, et al. Unraveling the causal nexus of cathepsins and rheumatoid arthritis: Insights from a two-sample Mendelian randomization framework. *Medicine (Baltimore).* 2025; 104(24): e42805.
84. Xue Q, Xue L, Ma, C, Ding H. Expression, clinical significance of cathepsin B, Beclin-1 in the gingival tissues of patients with peri-implantitis[J]. *China J Oral Maxillofacial Surg.* 2022; 20(3): 251-6.
85. Vidal CM, Tjäderhane L, Scaffa PM, Tersariol IL, Pashley D, Nader HB, et al. Abundance of MMPs and cysteine cathepsins in caries-affected dentin. *J Dent Res.* 2014; 93(3): 269-74.

86. Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, et al. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod.* 2010; 32(2): 131-9.
87. Mogi M, Ootogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(9): 894-8.
88. Garg G, Pradeep AR, Thorat MK. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(11): 1046-51.
89. Yamalik N, Günday S, Uysal S, Kiliç K, Karabulut E, Tözüm TF. Analysis of cathepsin-K activity at tooth and dental implant sites and the potential of this enzyme in reflecting alveolar bone loss. *J Periodontol.* 2012; 83(4): 498-505.
90. 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.
91. Dey G, Yakobovich E, Loboda J, Sinai-Turyansky R, Abramovitch-Dahan C, Merquiol E, et al. Development and Application of Small Molecule-Peptide Conjugates as Cathepsin K-Specific Covalent Irreversible Inhibitors in Human Osteoclast and Lung Cancer. *JACS Au.* 2025; 5(3): 1104-20.
92. Ochi Y, Yamada H, Mori H, Kawada N, Kayasuga R, Nakanishi Y, et al. ONO-5334, a cathepsin K inhibitor, improves bone strength by preferentially increasing cortical bone mass in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2014; 32(6): 645-52.
93. Khan MP, Singh AK, Singh AK, Shrivastava P, Tiwari MC, Nagar GK, et al. Odanacatib Restores Trabecular Bone of Skeletally Mature Female Rabbits With Osteopenia but Induces Brittleness of Cortical Bone: A Comparative Study of the Investigational Drug With PTH, Estrogen, and Alendronate. *J Bone Miner Res.* 2018; 33(11): 2084-5.
94. Pennypacker BL, Duong LT, Cusick TE, Masarachia PJ, Gentile MA, Gauthier JY, et al. Cathepsin K inhibitors prevent bone loss in estrogen-deficient rabbits. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(2): 252-62.
95. Stroup GB, Kumar S, Jerome CP. Treatment with a potent cathepsin K inhibitor preserves cortical and trabecular bone mass in ovariectomized monkeys. *Calcif Tissue Int.* 2009; 85(4): 344-55.
96. Jerome C, Missbach M, Gamse R. Balicatib, a cathepsin K inhibitor, stimulates periosteal bone formation in monkeys. *Osteoporos Int.* 2011; 22(12): 3001-11.
97. Kumar S, Dare L, Vasko-Moser JA, James IE, Blake SM, Rickard DJ, et al. A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both in vitro and in an acute model of elevated bone turnover in vivo in monkeys. *Bone.* 2007; 40(1): 122-31.
98. Podgorski I. Future of anticathepsin K drugs: dual therapy for skeletal disease and atherosclerosis? *Future Med Chem.* 2009; 1(1): 21-34.
99. Rüniger TM, Adami S, Benhamou CL, Czerwiński E, Farrerons J, Kendler DL, et al. Morphea-like skin reactions in patients treated with the cathepsin K inhibitor balicatib. *J Am Acad Dermatol.* ; 66(3): e89-96.

100. Udenigwe CC. Towards rice bran protein utilization: In silico insight on the role of oryzacystatins in biologically-active peptide production. *Food Chem.* 2016; 191: 135-38.
101. Balbinott N, Margis R. Review: Unraveling the origin of the structural and functional diversity of plant cystatins. *Plant Sci.* 2022; 321: 111342.
102. Premachandran K, Srinivasan TS. A brief review on oryzacystatin: a potent phytocystatin for crop management. *Mol Biol Rep.* 2023; 50(2): 1799-1807.
103. Simpson GA, Rezende IF, da Silva Peixoto A, de Oliveira Soares IB, Barbosa JARG, de Freitas SM, et al. Crystal structure and interconversion of monomers and domain-swapped dimers of the walnut tree phytocystatin. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2024; 1872(2): 140975.
104. Tremblay J, Goulet MC, Vorster J, Goulet C, Michaud D. Harnessing the functional diversity of plant cystatins to design inhibitor variants highly active against herbivorous arthropod digestive proteases. *FEBS J.* 2022; 289(7): 1827-41.
105. Santos NP, Brandstetter H, Dall E. *Arabidopsis thaliana* Phytocystatin 6 Forms Functional Oligomer and Amyloid Fibril States. *Biochemistry.* 2023; 62(23): 3420-9.
106. Bastías A, Correa F, Rojas P, Almada R, Muñoz C, Sagredo B. Identification and Characterization of Microsatellite Loci in Maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stunz) Using Next-Generation Sequencing (NGS). *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159825.
107. Waciewicz-Muczyńska M, Moskwa J, Puścion-Jakubik A, Naliwajko SK, Niczyporuk M, Socha K. Antioxidant Properties of Maqui Berry Extract (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) and Its Potential Photoprotective Role on Human Skin Fibroblasts. *Molecules.* 2023; 28(23): 7802.
108. Rivera-Tovar PR, Torres MD, Camilo C, Mariotti-Celis MS, Domínguez H, Pérez-Correa JR. Multi-response optimal hot pressurized liquid recovery of extractable polyphenols from leaves of maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) *Food Chem.* 2021; 357: 129729.
109. García-Milla P, Peñalver R, Nieto G. A Review of the Functional Characteristics and Applications of *Aristotelia chilensis* (Maqui Berry), in the Food Industry *Foods.* 2024; 13(6): 838.
110. Sandoval V, Femenias A, Martínez-Garza Ú, Sanz-Lamora H, Castagnini JM, Quifer-Rada P, et al. Lyophilized Maqui (*Aristotelia chilensis*) Berry Induces Browning in the Subcutaneous White Adipose Tissue and Ameliorates the Insulin Resistance in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *Antioxidants (Basel).* 2019; 8(9): 360.
111. Guo H, Weng W, Zhang S, Rinderknecht H, Braun B, Breinbauer R, et al. Maqui Berry and Ginseng Extracts Reduce Cigarette Smoke-Induced Cell Injury in a 3D Bone Co-Culture Model. *Antioxidants.* 2022; 11(12): 2460.
112. Rot AE, Hrovatin M, Bokalić B, Lavrih E, Turk B. Cysteine cathepsins: From diagnosis to targeted therapy of cancer. *Biochimie.* 2024; 226: 10-28.

113. Stoka V, Vasiljeva O, Nakanishi H, Turk V. The Role of Cysteine Protease Cathepsins B, H, C, and X/Z in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(21): 15613.
114. Barchielli G, Capperucci A, Tanini D. Therapeutic cysteine protease inhibitors: a patent review (2018-present). *Expert Opin Ther Pat.* 2024; 34(1-2):17-49.
115. Jiang H, Dong Z, Xia X, Li X. Cathepsins in oral diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Front Immunol.* 2023; 14: 1203071.
116. Chen K, Xu M, Lu F, He Y. Development of Matrix Metalloproteinases-Mediated Extracellular Matrix Remodeling in Regenerative Medicine: A Mini Review. *Tissue Eng Regen Med.* 2023; 20(5): 661-70.
117. Nagase H, Salvesen G. Advances in the study of proteolytic enzymes. *Methods Enzymol.* 2001; 341: 1-13.
118. Novinec M, Lenarčič B. Cysteine cathepsins as digestive proteases in carnivorous plants. *Plant Signal Behav.* 2013; 8(9): e25690.
119. Cassiano AFB, Coaguila-Llerena H, Santos CS, da Silva LR, Nogueira LFB, Ciancaglini P, et al. The Effect of Octenidine on Proliferation, Migration, and Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp and Apical Papilla Stem Cells. *J Endod.* 2022;48(12):1502-10 e1.
120. Cassiano AFB, de Souza EP, Hernán Coaguila-Llerena EH, Henrique-Silva F, Faria G. Effect of sugarcane cystatin CaneCPI-5 on osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *Braz Dent J.* 2025; [aceito]
121. Hu X, Liu C, Tang Z, Pan M, Fang A, Li L, et al. Sophoraflavanone G as an ectosteric inhibitor of cathepsin K attenuates ovariectomy-induced bone loss by suppressing bone resorption. *Phytomedicine.* 2025; 141: 156720.
122. Yang H, Li X, Li G, Huang H, Yang W, Jiang X, et al. Accurate quantitative determination of affinity and binding kinetics for tight binding inhibition of xanthine oxidase. *Biomed Pharmacother.* 2021; 139: 111664.
123. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009; 88(9): 792-806.
124. Bakopoulou A, Papachristou E, Bousnaki M, Hadjichristou C, Kontonasaki E, Theocharidou A, et al.. Human treated dentin matrices combined with Zn-doped, Mg-based bioceramic scaffolds and human dental pulp stem cells towards targeted dentin regeneration. *Dent Mater.* 2016; 32(8): e159-75.
125. Liu J, Du J, Chen X, Yang L, Zhao W, Song M, et al. The Effects of Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathways on Lipopolysaccharide-mediated Osteo/Odontogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod.* 2019; 45(2): 161-7.
126. Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J.* 2011; 44(10): 889-906.
127. Zhou Z, Fan Y, Jiang Y, Shi S, Xue C, Zhao X, et al. Mineralized Enzyme-Based Biomaterials with Superior Bioactivities for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022; 14(32): 36315-36330.

128. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; 19(8): 1745-54.
129. Tsao YT, Huang YJ, Wu HH, Liu YA, Liu YS, Lee OK. Osteocalcin Mediates Biomineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 159.
130. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol.* 2011; 56(7): 709-21.
131. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1): 189-95.
132. Seshi B, FD S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis.* 2000; 26(3): 234-46.
133. Khan SZ, Kokubu E, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of rat-cultured dental pulp cells in three-dimensional collagen type-1 gel in vitro and in vivo. *Aust Endod J.* 2013; 39(3): 137-45.
134. Sabbagh J, Ghassibe-Sabbagh M, Fayyad-Kazan M, Al-Nemer F, Fahed JC, Berberi A, et al. Differences in osteogenic and odontogenic differentiation potential of DPSCs and SHED. *J Dent.* 2020; 101: 103413.
135. Hensley AP, McAlinden A. The role of microRNAs in bone development. *Bone.* 2021; 143: 115760.
136. Liu J, Zhao J, Li Z, Wang H, Wang B, Liu W, et al. Dentin Matrix Protein 1 Regulates Mineralization of MC3T3-E1 Cells via the TNAP-ANK-ENPP1 Axis. *J Nippon Med Sch.* 2023; 90(3): 262-71.