

Atendendo solicitação da autora, o
texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
29/11/2021



UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



KENNIA SCAPIN VIOLA

**Cistatina recombinante da *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) induz proliferação,
migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana**

Araraquara – SP
2019



UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



KENNIA SCAPIN VIOLA

Cistatina recombinante da *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) induz proliferação, migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: **Profa. Dra. Gisele Faria**

Coorientador: **Dra. Elisandra Márcia Rodrigues**

Araraquara - SP
2019

Viola, Kennia Scapin

Cistatina recombinante da *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) induz proliferação, migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana / Kennia Scapin Viola. -- Araraquara: [s.n.], 2019

52 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

Coorientadora: Dra. Elisandra Márcia Rodrigues

1. Cistatinas 2. Diferenciação celular 3. Polpa dentária
4. Endodontia I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

KENNIA SCAPIN VIOLA

**Cistatina recombinante da *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) induz proliferação,
migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana**

Comissão julgadora

Defesa de Tese para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Gisele Faria

2º Examinador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

3º Examinador: Profa. Dra. Diana Gabriela Soares

4º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

5º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho

Araraquara, 29 de novembro de 2019

DADOS CURRICULARES

KENNIA SCAPIN VIOLA

Nascimento:	10 de novembro de 1990 - Jales – SP
Filiação:	Dorivaldo Donizeth Viola Clarice Scapin Viola
2008-2012	Curso de Graduação em Odontologia Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
2011-2011	Extensão universitária em Cirurgia oral menor. Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
2011-2011	Extensão universitária em Prótese dentária. Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
2011-2011	Extensão universitária em Periodontia. Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
2012-2012	Extensão universitária em Endodontia. Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
2012-2012	Extensão universitária em Implantodontia. Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
2013-2014	Aluna especial de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr UNESP- Araraquara-SP
2014-2016	Curso de Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr UNESP/FAEPO- Araraquara-SP
2014-2016	Curso de Pós-Graduação em Endodontia - Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr UNESP- Araraquara-SP
2017-2018	Extensão universitária em Dentística Restauradora. Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa em Odontologia (FAEPO) – Araraquara-SP
2016-2019	Curso de Pós-Graduação em Endodontia - Nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr UNESP- Araraquara-SP

Dedico este trabalho aos meus pais, **Dorivaldo e Clarice!** Sou eternamente grata a vocês, pois mesmo vindo de família simples e diante das dificuldades, sempre se esforçaram e abdicaram de muitas coisas para conseguirem formar os seus três filhos. A presença de vocês torna os momentos de conquistas mais prazerosos e os momentos difíceis mais leves, sendo de fundamental importância para eu atingir os meus objetivos. Portanto, a conclusão dessa tese e dessa fase da minha vida não é somente minha, é nossa!

Agradecimentos

Um grande desafio que encontrei na vida acadêmica foi a escrita. Para mim é a parte mais difícil para desenvolver um trabalho. Desafio ainda maior é fazer uma análise regressiva cuidadosa para lembrar da significância de todas as pessoas participaram na minha trajetória.

Durante todo esse caminho percorrido, o que não me faltaram foram motivos para agradecer. Digo que fui muito abençoada e uma mulher de sorte! Digo isso por que é uma dádiva ter amigos e pessoas com quem pude contar e sempre quiseram meu o bem.

Começo agradecendo à **DEUS**, que guia minha vida. Obrigada por me proporcionar saúde, força, paciência, sabedoria, persistência e dedicação para nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada senhor pela família espetacular que tenho, pois é nela que me encontro mais perto de ti.

Toda essa gratidão que tenho iniciou-se há 29 anos atrás. Tive a honra de ser filha de **Dorivaldo** e **Clarice** os quais me deram dois irmãos **Kelly** e **Bruno**, meus verdadeiros tesouros. Sou grata a vocês meus irmãos pelo companheirismo, por todo apoio e confiança que depositaram em mim. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos e peço desculpas pelos momentos de afastamento, impaciência e até de algumas “briguinhas”. Confesso que sou a pessoa mais orgulhosa do mundo, pois quando eu defendi o meu mestrado meus irmãos eram graduandos em medicina, e hoje nossa..., só me enchem de alegria pelos médicos que se tornaram. Como o tempo passa rápido, não?! Desejo a vocês toda sorte do mundo e estou na torcida para que vocês conquistem seus objetivos. Amo muito vocês!

E se tratando de família, eu não posso deixar de agradecer a todos meus tios, tias, primos e primas que de forma direta e indiretamente também me deram apoio para seguir em frente. Em especial a minha prima-irmã **Jenifer**, ou melhor dizendo Jeninha, que sempre acompanhou mais de perto a minha jornada, dando sempre apoio e acreditando em minha capacidade. Você e a Kelly são minhas saudades diárias. Te amo viu rsrs...

Ainda quando eu estava na graduação me despertou o interesse por fazer iniciação científica, coisa que não havia na faculdade particular que eu cursava. Esse foi o primeiro passo para me despertar o interesse em fazer pós-graduação. E não é que tive a “sorte” de ser concedida com a bolsa de iniciação científica por intermédio da UNESP/FOAr?!

E tive “sorte” mesmo! No começo da iniciação científica encontrei uma orientadora que foi de essencial importância na minha curva de aprendizagem como profissional, afinal, me acompanhou desde o último ano de graduação, um ano de aluna especial, mestrado e agora doutorado. Sou muito grata as suas orientações **Profa. Dra. Gisele Faria**, e por ter me recebido como orientada. Não posso deixar de agradecer pela sua paciência, por sempre estar disponível a corrigir falhas, verificando sempre os mínimos detalhes. Foi muito bom trabalhar com a professora todos esses anos, mesmo em momentos difíceis que sem o trabalho em parceria não daria certo. Ao exemplo de orientadora, minha admiração e gratidão.

Agradeço em especial a **Elisandra Márcia Rodrigues**, ou simplesmente Eli! Minha co-orientadora, amiga, conselheira o que eu faria sem você todos esses anos hein?! Sou eternamente grata a Deus pela nossa amizade, foi realmente um presente mais que especial. Obrigada pelos seus ensinamentos diários, por me corrigir quando necessário, por ser sincera e competente. Agradeço muito a sua dedicação e colaboração nessa pesquisa, pois foram papéis fundamentais para concluí-la. Agradeço também pelos momentos que vibramos juntas as nossas vitórias e momentos em que enxugamos as lágrimas uma da outra. Desde já sinto uma saudade enorme da nossa convivência diária, seja em viagens para realizar experimentos ou nas longas jornadas no laboratório, sendo durante a semana, feriados ou mesmo nos finais de semana e de ir ao laboratório cuidar das nossas “filhinhas”. Meus sinceros agradecimentos!

Agradeço em especial o **Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho**, que me acolheu muito bem no programa de Pós-graduação em Odontologia, tanto como aluna especial como aluna regular da pós-graduação. Obrigada, por ter paciência, respeito e confiar em mim. Admiro o quanto é preocupado e sempre quer o melhor para os alunos da pós-graduação. Meu sincero obrigada.

Agradeço também o **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, por ser o principal responsável pela minha vinda para Araraquara para fazer iniciação científica. Agradeço pela sua forma de ensinar e pela constante aprendizagem a cada conversa no dia-a-dia. Muito obrigada pela sua amizade.

Também tive a sorte de conhecer e conviver com professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP/FOAr. Agradeço a **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, com seus conhecimentos e seu jeito prático de resolver as coisas e sua amizade. **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho** admiro sua bondade e seu vasto conhecimento clínico. **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, com seus ensinamentos nos estágios docência, especialização e pela amizade. **Prof. Dr. Renato de**

Toleto Leonard com os ensinamentos clínicos sempre atualizados e pela amizade construída. Minha eterna gratidão a todos!

Nesta caminhada da pós-graduação acabei encontrando pessoas especiais que acabaram tornando uma verdadeira família científica, pois foi no Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara que eu passava grande parte das minhas horas diárias. Sou grata a todos sem exceção, pois sem vocês com certeza a minha estadia aqui seria mais dificultosa. Mas eu não poderia deixar de fazer um agradecimento especial para alguns...

Maria Luiza, Mariana Pivoto-João, Cristiane, amigas-irmãs que o doutorado me deu. Sou grata pela amizade construída, trocas de conhecimentos e companheirismo. Com vocês o caminho até aqui foi mais proveitoso e animado. **Lauriê, Gabriela, Wilfredo e Fernanda**, os amigos sobreviventes do mestrado, não é mesmo?! Agradeço muito a amizade que construímos ao longo desses “quase” 6 anos, com certeza vou levar para vida toda. **Gissele**, ou simplesmente Gi peruana. O que seria do departamento sem a Gi hein?! Gi, você é uma das poucas pessoas que continuam no departamento desde que eu cheguei e sempre esteve presente me ensinando e apoiando quando preciso. Obrigado por tudo, pela amizade e pelos bolos de Santo Antônio, mas não consegui casar não hein. Com certeza passamos bons momentos juntos que vou levar pra vida toda e em meu coração. Obrigada e contem sempre comigo.

Eu não poderia deixar de agradecer as minhas amigas que a vida me deu durante a graduação **Mariane Alcalá**, a pós-graduação **Camila Lorenzetti** e a vinda para Araraquara **Gabriela Pregnotato** pelo convívio mais próximo, incentivo e apoio.

Além disso, gostaria de fazer um agradecimento especial para as pessoas que me proporcionaram um conhecimento maior para realizar essa pesquisa. **Profa. Andrea Soares da Costa Fuentes** pela colaboração, disponibilidade, ajuda nos experimentos e pela amizade construída. À pós-doc **Daniela Morilha Néo Justino** e doutoranda **Sâmara Vieira Rocha** do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela ajuda constante nos ensaios de Western Blotting e pela amizade. Aos **Profs. Mário Tanomaru-Filho, Joni Augusto Cirelli e Willian Fernando Zambuzzi**, por participarem do nosso grupo de pesquisa nos dando o apoio necessário. Meu muito obrigada!

Não menos importante, devo agradecer os **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Marinho, Wanderley, Creusa, Cida e Lindinha** pelo convívio, simpatia e por sempre me ajudarem. Aos

funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **José Alexandre e Cristiano**, e o funcionário do escritório de pesquisa, **Renan** pelo auxílio prestado, pela disponibilidade e pela atenção com que sempre atenderam às minhas solicitações.

Não poderia faltar o agradecimento à diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e ao vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves Campos** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP-FOAr, pela atenção, amizade construída e por me darem a oportunidade de realizar a pós-graduação nesta Instituição.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/05784-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei
para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

(Marthín Luther Kíng)

Viola KS. Cistatina recombinante da *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) induz proliferação, migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

As cistatinas são inibidores naturais de cisteíno proteases e desempenham um papel crítico no controle da degradação de proteínas. As cistatinas de plantas, dentre elas a cistatina produzidas de forma recombinante a partir da *Citrus sinensis* (CsinCPI-2), têm mostrado potencial para serem usadas em diferentes abordagens terapêuticas. Os objetivos deste estudo foram avaliar a citocompatibilidade e o efeito da fitocistatina CsinCPI-2 sobre a proliferação, migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana (hDPCs). Previamente à realização dos ensaios, as hDPCs foram caracterizadas quanto a expressão de marcadores de células tronco mesenquimais por meio de citometria de fluxo. hDPCs expostas à CsinCPI-2 e não expostas (controle) foram avaliadas quanto à viabilidade celular por meio dos ensaios de metiltiazol tetrazólio (MTT) e *alar blue*, apoptose por meio de citometria de fluxo, atividade da fosfatase alcalina (ALP) por meio do cálculo da liberação de timolfitaleína, produção de nódulos mineralizados por meio de coloração com vermelho de alizarina, migração celular pelo ensaio de *transwell*, proliferação por meio de ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e expressão gênica de proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), fator de transcrição osteogênica (RUNX2), fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina (OC), sialoproteína óssea (BSP) e proteína da matriz da dentina (DMP-1) por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real quantitativa (qPCR). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) one way e pós-teste de Turkey, ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni ou teste t ($\alpha = 0,05$). As hDPCs utilizadas nos ensaios mostraram marcação positiva para células tronco mesenquimais (CD105, CD90, CD73, CD146) e negativa para células hematopoiéticas e endoteliais (CD45, CD34). A CsinCPI-2 foi citocompatível e não induziu apoptose. Houve maior formação de nódulos mineralizados, atividade de ALP, proliferação e migração celular e maior expressão dos genes BMP-2, RUNX2, ALP, OC, BSP e DMP-1 no grupo da CsinCPI-2 em relação ao controle ($P < 0,05$). Em conclusão, a CsinCPI-2 foi citocompatível, induziu migração e proliferação celular, bem como a diferenciação de hDPCs em fenótipo osteogênico. Portanto, a CsinCPI-2 pode ser uma molécula promissora para ser utilizada em técnicas de regeneração/reparação pulpar e periapical.

Palavras-chave: Cistatinas. Diferenciação celular. Polpa dentária. Endodontia.

Viola KS. *Citrus sinensis* recombinant cystatin (CsinCPI-2) induces migration, proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp cells. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Cystatins are natural inhibitors of cysteine proteases and play a critical role in controlling protein degradation. Plant cystatins, among them a cystatins recombinantly produced from *Citrus sinensis* (CsinCPI-2), have shown potential to be used in different therapeutic approaches. The objectives of this study were to evaluate the cytocompatibility and effect of phytocystatin CsinCPI-2 on the proliferation, migration and osteogenic differentiation of human dental pulp cells (hDPCs). Previously to the performing the assays, hDPCs were characterized for the expression of mesenchymal stem cell markers by flow cytometry. hDPCs exposed to CsinCPI-2 and unexposed (control) were evaluated from cell viability by the methylthiazole tetrazolium (MTT) and *alamar blue* assays, apoptosis by flow cytometry, alkaline phosphatase (ALP) activity by calculation of thymolphthalein release, production of mineralized nodules by alizarin red staining, migration cells by Transwell assay, proliferation by bromodeoxyridine (BrdU) incorporation assay and gene expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), transcription factor (RUNX2), alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), bone sialoprotein (BSP) and dentine matrix protein -1 (DMP-1) by quantitative real time PCR (qPCR). The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Turkey post-test, two-way ANOVA and Bonferroni post-test or t-test ($\alpha = 0.05$). hDPCs used in assays showed positive marking for mesenchymal stem cells (CD105, CD90, CD73, CD146) and negative to hematopoietic and endothelial cells (CD45, CD34). CsinCPI-2 was cytocompatible and induced no apoptosis. There was greater formation of mineralized nodules, ALP activity, proliferation and migration cells and greater expression of BMP-2, RUNX2, ALP, OC, BSP and DMP-1 genes in CsinCPI-2 group compared to control ($P < 0, 05$). In conclusion, CsinCPI-2 was cytocompatible, induced cell migration and proliferation, as well as differentiation of hDPCs into osteogenic phenotype. Therefore, CsinCPI-2 may be a promising molecule for used in pulp and periapical regeneration/repair techniques.

Keywords: Cystatins. Cell differentiation. Dental pulp. Endodontics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 PROPOSIÇÃO.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante <i>CsinCPI-2</i>	20
3.2 Cultura Celular	20
3.3 Caracterização Imunofenotípica das Culturas de hDPCs	21
3.4 Avaliação da Viabilidade/Metabolismo Celular por Ensaio de MTT.....	22
3.5 Avaliação da Viabilidade por Ensaio de Alamar Blue.....	22
3.6 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP).....	23
3.7 Análise de Apoptose por Citometria de Fluxo.....	24
3.8 Ensaio de Coloração com Vermelho de Alizarina.....	24
3.9 qPCR	25
3.10 Ensaio de Proliferação Celular	26
3.11 Ensaio de Migração Celular por <i>Transwell</i>	26
3.12 Análise Estatística	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Caracterização Imunofenotípica de Culturas de hDPCs.....	28
4.2 Viabilidade Celular	28
4.3 Atividade de ALP	29
4.4 Apoptose	31
4.5 Coloração Vermelho de Alizarina (ARS)	32
4.6 Análise da Expressão Gênica de Marcadores Osteogênicos por qPCR.....	32
4.7 Ensaio de Proliferação Celular	34
4.8 Ensaio de Migração Celular por <i>Transwell</i>	34
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A.....	49

1 INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo dinâmico, necessitando de um balanço fino entre deposição de novo osso e reabsorção de componentes existentes da matriz mineralizada. Neste cenário, mecanismos de reabsorção dependem da ação de proteases específicas capazes de degradar a matriz orgânica, predominantemente composta por colágeno do tipo I, e da solubilização do componente mineral inorgânico pela produção e bombeamento de prótons pelos osteoclastos, tornando o microambiente ácido¹. A degradação da matriz orgânica é realizada por metaloproteases da matriz (MMPs) e por cisteíno proteases, principalmente por ação da catepsina K².

Cisteíno proteases estão presentes em animais, plantas, vírus, bactérias e protozoários³ e estão divididas em 76 famílias e 8 clãs⁴. O sequenciamento do genoma humano publicado em 2003 mostrou a existência de 11 cisteíno proteases, também conhecidas como catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W). Essas catepsinas são proteases lisossomais e pertencem a família das papaínas proteases ou C1⁵. As catepsinas degradam as proteínas da matriz extracelular como o colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanas^{6,7}. Elas participam de processos fisiológicos, como remodelação tecidual, *turnover* da matriz extracelular, funções do sistema imune, entre outros⁸. Por outro lado, essas enzimas também estão envolvidas em vários processos patológicos, especialmente em doenças envolvendo remodelação tecidual como a doença de Alzheimer, osteoporose, artrite, invasão tumoral, metástase, doença periodontal e periodontite apical - lesão periapical^{6, 8-11}.

Por sua vez, a catepsina K é uma cisteíno protease lisossomal que desempenha um papel chave na reabsorção óssea, motivo pelo qual tem emergido como alvo promissor para o tratamento de determinadas osteopatias, como a osteoporose⁸. Ela é altamente expressa pelos osteoclastos e desempenha um papel essencial na função destas células e na degradação dos componentes proteicos da matriz, incluindo o colágeno tipo I, com subsequente destruição tecidual durante a reabsorção óssea¹². A catepsina K representa 98% da atividade de cisteíno proteases ósseas².

A catepsina B, expressa em diversos tipos celulares, incluindo osteoclastos, também participa dos processos de reabsorção^{13,7} e remodelação óssea¹⁴. Além disso, a catepsina B está ligada à ativação de procólagenase, prostromelina e pro-uPA, enzimas envolvidas na cascata proteolítica observadas na degradação focal de osteóide¹⁵ e matrizes tumorais¹⁶.

Na Odontologia, as catepsinas têm um importante papel patogênico na doença cárie, participando efetivamente na cavitação das lesões¹⁷. Sequencialmente, as catepsinas participam

da degradação da matriz colagênica da dentina e, posteriormente, ativam a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), uma importante enzima envolvida na reabsorção da dentina^{18,19}. As catepsinas estão presentes na dentina e são expressas nos odontoblastos e no tecido pulpar, sendo a catepsina B, uma das que apresentam maior expressão²⁰. A catepsina B também tem sido associada à degradação do colágeno da matriz em gengivites e periodontites²¹ e está envolvida nos processos de remodelação óssea que ocorrem durante o tratamento ortodôntico¹⁴. A catepsina K está envolvida na osteoclastogênese durante o desenvolvimento da lesão periapical^{22,10}. Gao et al.⁹ mostraram que o silenciamento da expressão do gene da catepsina K reduziu significativamente a destruição óssea e a expressão das citocinas em lesões periapicais induzidas em ratos. Estudos recentes têm mostrado que inibidores de catepsina K reduzem a reabsorção óssea pela inibição da função de osteoclastos e a síntese de mediadores inflamatórios, diminuindo a expansão da lesão periapical em ratos. Os autores desses estudos sugeriram que inibidores de catepsina K poderiam ser utilizados para o tratamento da periodontite apical - lesão periapical^{10,23}.

Os inibidores da catepsina K (cistatinas) são uma classe emergente de fármacos que são potentes antagonistas da atividade osteoclástica²⁴ e o seu uso leva a redução da perda óssea, por exemplo em casos de osteoporose²⁵. As cistatinas inibem reversivelmente as catepsinas e o seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva por meio do bloqueio da atividade proteolítica²⁶. As cistatinas de humanos têm um papel crítico no controle da degradação de proteínas, pois algum desequilíbrio pode resultar em processos patológicos como câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e reabsorção óssea⁸.

Outra possível ação das cistatinas, mostrada no estudo de Danjo et al.²⁷, é o efeito pró-osteogênico. Os autores utilizaram a cistatina C (CysC) que é um inibidor natural de cisteíno-protease que suprime a diferenciação e função de reabsorção de osteoclastos. Células da medula e da calvária de ratos tratadas com CysC apresentaram elevada expressão do mRNA de proteína morfogenética óssea -2 (BMP-2) e do fator de transcrição osteogênica (RUNX2), além de aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP), mineralização da matriz óssea e formação de osso da calvária. Além disso, trabalho desenvolvido por Fuller et al.²⁸ mostrou que o inibidor de catepsina K (MV061194 - Medivir UK Ltd., Little Chesterford, Essex, UK) suprime a degradação de fatores de crescimento como a BMP-2 da matriz orgânica e, conseqüentemente aumenta a formação óssea²⁸.

As cistatinas são proteínas evolutivamente relacionadas e agrupadas na “superfamília cistatina”. Membros desta superfamília são classificados em quatro famílias de cistatinas. Três de origem animal e uma da família de cistatinas de plantas²⁹. A família 1, ou família das

estefinas, é uma cistatina intracelular presente no citosol de muitos tipos celulares e nos fluidos do corpo em concentrações significantes³⁰. A família 2, ou família cistatina, é principalmente secretada extracelularmente e é amplamente distribuída e encontrada na maioria dos fluidos corporais³¹. Na família 3, ou família cininogênio, estão os cininogênios do plasma sanguíneo. A família 4, ou família das fitocistatinas, compreende os inibidores de cisteína proteases de plantas²⁹. As fitocistatinas possuem características genômicas e estruturais que as diferem das cistatinas animais²⁹. Elas são proteínas pequenas, com massa molecular de 12-16kDa³² e são encontradas em uma grande variedade de plantas superiores, principalmente em angiospermas como no arroz, milho, soja, figo e cana-de-açúcar, laranja, entre outras^{33,34}. As fitocistatinas apresentam capacidade de inibir enzimas da classe C1A ou papaínas³⁵ e estão envolvidas na regulação da atividade das proteases endógenas durante a maturação de sementes, e na defesa contra cisteína proteinases exógenas de insetos³². A identificação de novas fitocistatinas é facilitada pela disponibilidade de bancos de ESTs (*expressed sequence tag*) originados em projetos de sequenciamento em grande escala. Reis & Margis³¹ identificaram, por meio do projeto genoma da cana-de-açúcar, 25 *clusters* para fitocistatinas, classificados em 4 grupos. Estas proteínas inibem, principalmente, as enzimas pertencentes à família C1A (papaína) e a família C13 (leguminosa)³⁶.

A cistatina derivada da cana-de-açúcar foi caracterizada e denominada de canacistatina. Essa fitocistatina é produzida de forma recombinante e apresenta expressão de aproximadamente 15kDa³³. Ela inibe as catepsinas humanas B, K, L e V, a cisteína peptidases de plantas papaína e baupaína³⁷ e o crescimento de fungos filamentosos de *Trichoderma reesei*³³. Atualmente existem cinco cistatinas recombinantes derivadas da cana-de-açúcar que são denominadas CaneCPI-1, CaneCPI -2, CaneCPI -3, CaneCPI -4 and CaneCPI -5³⁸⁻⁴¹. Estudos têm mostrado que as canacistatinas reduzem a invasão de células tumorais *in vitro*⁴², inibem o desenvolvimento de melanoma *in vivo*, são capazes de diminuir o processo de angiogênese *in vitro* e *in vivo*³⁹ e reduzem significativamente a erosão inicial do esmalte dental⁴¹.

Mais recentemente, uma cistatina derivada da laranja doce (*Citrus sinensis*), denominada CsinCPI-2, foi subclonada de forma recombinante e expressa com massa molar de 11,18 kDa. Essa fitocistatina foi obtida de forma semelhante a cistatina recombinante CaneCPI-1³³, ambas no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de São Carlos. Estudo de nosso grupo de pesquisa mostrou que a CsinCPI-2 inibiu as catepsinas humanas B e K e apresentou potencial anti-inflamatório⁴³.

A reparação pulpar, periapical e a “regeneração” endodôntica envolvem a proliferação, migração e diferenciação de células tronco mesenquimais da polpa dental e da papila apical em

osteoblastos e odontoblastos-*like* no local da injúria, o que leva à formação de tecido mineralizado⁴⁴⁻⁴⁶. Portanto a capacidade de induzir a diferenciação osteo/odontogênica de células mesenquimais é uma das características desejáveis de materiais para serem utilizados no reparo pulpar e periapical e em técnicas de regeneração endodôntica^{47,48}. A identificação de substâncias bioativas para a diferenciação osteo/odontoblástica de células tronco mesenquimais da polpa ou da papila apical é um grande desafio para identificar futuros tratamentos terapêuticos^{49,46}.

6 CONCLUSÃO

A *CsinCPI-2* foi citocompatível, induziu proliferação e migração celular, bem como o desenvolvimento de fenótipo osteogênico em hDPCS.

REFERÊNCIAS*

- 1-Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 1989; 245(4920): 855-57.
- 2-Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol*. 1996; 74(6): 759-75.
- 3-Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczak W, et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol*. 2001; 48(1): 1-20.
- 4-Rawlings ND, Barret AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(Database issue): D343-50.
- 5-Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids Res*. 2006; 34(Database issue): D270-72.
- 6-Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*. 1997; 378(3-4): 141-50.
- 7-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.
- 8-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.
- 9-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.

*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>

- 10-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* 2015a; 83(4): 1235-45.
- 11-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* 2015b; 86(8): 972-83.
- 12-Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(23): 13453–8.
- 13-Söderström M, Salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, Vuorio E. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1446(1-2): 35-46.
- 14-Rhee SH, Kang J, Nahm DS. Cystatins and cathepsin B during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009; 135(1): 99-105.
- 15-Aisa MC, Beccari T, Costanzi E, Maggio D. Cathepsin B in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1621(2): 149-59.
- 16-Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J*. 1992; 282(Pt 1): 273-8.
- 17-Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldini S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011; 90(4): 506-11.
- 18-Okamura T, Shimokawa H, Takagi Y, Ono H, Sasaki S. Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by *in situ* hybridization. *Calcif Tissue Int*. 1993; 52(4): 325-30.
- 19-Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgård M, Dodds R, Hultenby K et al. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acidphosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J Biol Chem*. 2005; 280(31): 28370-81.
- 20-Tersariol IL, Geraldini S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod*. 2010; 36(3): 475-81.

- 21-Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Ultrastructural localization of cathepsin B in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Histochem J.* 1997; 29(10): 727-734.
- 22-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.
- 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): 1474-79.
- 24-Yu NY, Fathi A, Murphy CM, Mikulec K, Peacock L, Cantrill LC et al. Local co-delivery of rhBMP-2 and cathepsin K inhibitor L006235 in poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017; 105(1): 136-44.
- 25-Duong le T, Leung AT, Langdahl B. Cathepsin K Inhibition: A new mechanism for the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2016; 98(4): 381-97.
- 26-Abrahamson M. Cystatins – Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *J Braz Assoc Advanc Scienc.* 1993; 5: 229-304.
- 27-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.
- 28-Fuller K, Lawrence KM, Ross JL, Grabowska UB, Shiroo M, Samuelsson B et al. Cathepsin K inhibitors prevent matrix-derived growth factor degradation by human osteoclasts. *Bone.* 2008; 42(1): 200-211.
- 29-Margis R, Reis EM, Villeret V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 359(1): 24-30.
- 30-Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters.* 1991; 285(2): 213-219.

- 31-Reis EM, Margis R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analyses. *Gen Mol Biol.* 2001; 24(1-4): 291-296.
- 32-Martinez M, Santamaria ME, Diaz-Mendoza M, Arnaiz A, Carrillo L, Ortego F et al. Phytocystatins: defense proteins against phytophagous insects and acari. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10) pii: E1747.
- 33-Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique –Silva F. A sugar cane cystatin recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296(5): 1194-1199.
- 34-Oliveira AS, Xavier-Filho J, Salles MP. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives.* 2003; 46(1): 91-104.
- 35-Benchabane M, Schlüter U, Vorster J, Goulet MC, Michaud D. Plant cystatins. *Biochimie.* 2010; 92(11): 1657-66.
- 36-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 Letters.* 1998; 422(1): 61-4.
- 37-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): 1082-86.
- 38-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.
- 39-Oliveira JP, Magliarelli HF, Pereira VF, Gianotti A, Soares-Costa A, Henrique-Silva F et al. Sugarcane cystatin CaneCPI-4 inhibits melanoma growth by angiogenesis disruption. *J Cancer SciTher.* 2011; 3(7): 161-7.
- 40- Soares-Costa A, Silveira RS, Novo MT, Alves MF, Carmona AK, Belasque J Jr et al. Recombinant expression and characterization of a cysteine peptidase from *Xanthomonas citri subsp citri*. *Genet Mol Res.* 2012; 11(4): 4043-57.

- 41-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):1051-57.
- 42-Gianotti A, Sommer CA, Carmona AK, Henrique-Silva F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. *Biol Chem*. 2008; 389(4): 447-53.
- 43-Leguizamón NDP, Rodrigues EM, de Campos ML, et al. In vivo and in vitro anti inflammatory and pro-osteogenic effects of citrus cystatin *CsinCPI-2*. *Cytokine*. 2019; 123:154760. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154760.
- 44-Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent*. 2014; 42(4): 490-7.
- 45-Zhu L, Yang J, Zhang J, Peng B. A comparative study of BioAggregate and ProRoot MTA on adhesion, migration, and attachment of human dental pulp cells. *J Endod*. 2014; 40(8): 1118-23.
- 46-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): 161-167.
- 47-Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(2): 605-15.
- 48- Rathinam E, Rajasekharan S, Chitturi RT, Declercq H, Martens L, De Coster P. Gene Expression profiling and molecular signaling of various cells in response to tricalcium silicate cements: a systematic review. *J Endod*. 2016; 42(12): 1713-25.
- 49- Kim DS, Jue SS, Lee SY, Kim YS, Shin SY, Kim EC. Effects of glutamine on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod* 2014; 40(8): 1087-94.

50-Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(25): 13625-30.

51-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.

52-Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

53-Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(5): 703-10.

54-Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1981; 27(3): 493-501.

55-Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1): 39-51.

56- Heng BC, Ye X, Liu Y, Dissanayaka WL, Cheung GS, Zhang C. Effects of recombinant overexpression of Bcl2 on the proliferation, apoptosis, and osteogenic/odontogenic differentiation potential of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2016; 42(4): 575-83.

57- Qin W, Gao X, Ma T, Weir MD, Zou J, Song B et al. Metformin enhances the differentiation of dental pulp cells into odontoblasts by activating AMPK signaling. *J Endod*. 2018; 44(4): 576-584.

58-Bakopoulou A, Georgopoulou A, Grivas I, Bekiari C, Prymak O, Loza K et al. Dental pulp stem cells in chitosan/gelatin scaffolds for enhanced orofacial bone regeneration. *Dent Mater*. 2019; 35(2): 310-327.

- 59-Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 460(1): 72-81.
- 60-Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patologia básica*. 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. cap.1, p.1-28.
- 61-D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019; 43(6): 582-92.
- 62- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*. 2003; 53 Suppl 3: S61-70.
- 63-Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.
- 64- Holland R, Gomes JE Filho, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(5): 465-476.
- 65-Cell proliferation Elisa BrdU [Bula]. Mannheim, Alemanha: Roche Applied Science; 2013
- 66- Reis MV, Moura CC, Silva MV, Souza MA, Soares PB, Soares CJ. Effect of lectin (ScLL) on fibroblasts stimulated with LPS - an in vitro study. *Braz Oral Res*. 2016; 30(1): e140.
- 67- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*. 2013; 752(1): 10-24.
- 68- Luo Z, Wang Z, He X, Liu N, Liu B, Sun L et al. Effects of histone deacetylase inhibitors on regenerative cell responses in human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2018; 51(7): 767-78.
- 69- Deniz Sungur D, Aksel H, Ozturk S, Yılmaz Z, Ulubayram K. Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability. *Int Endod J*. 2019; 52(6): 838-46.

- 70- Chai J, Jin R, Yuan G, Kanter V, Miron RJ, Zhang Y. Effect of liquid platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma on the regenerative potential of dental pulp cells cultured under inflammatory conditions: a comparative analysis. *J Endod*. 2019; 45(8): 1000-8.
- 71- Yasueda T, Abe Y, Shiba M, Kamo Y, Seto Y. A new insight into cystatin C contained in milk basic protein to bone metabolism: effects on osteoclasts and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *Anim Sci J*. 2018; 89(7): 1027-32.
- 72- Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem*. 1996; 237(1): 295-302.
- 73- Wu X, Shi W, Cao X. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116: 29-49.
- 74- Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 2010; 339(1): 189-95.
- 75- 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.
- 76- Seshi B, Kumar 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.
- 77- 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.
- 78- Lee BN, Chun SJ, Chang HS, Hwang YC, Hwang IN, Oh WM. Physical properties and biological effects of mineral trioxide aggregate mixed with methylcellulose and calcium chloride. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(6): 680-88.

- 79- Cooper LF, Harris CT, Bruder SP, Kowalski R, Kadiyala S. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res*. 2001; 80(1): 314-20.
- 80- Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*. 2006; 13(7): 611-20.
- 81- da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018; 51(8): 829-46.
- 82- Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(9): 1165-75.
- 83- Homayounfar N, Verma P, Nosrat A, El Ayachi I, Yu Z, Romberg E et al. Isolation, characterization, and differentiation of dental pulp stem cells in ferrets. *J Endod*. 2016; 42(3): 418-24.
- 84- Lee HS, Jung EY, Bae SH, Kwon KH, Kim JM, Suh HJ. Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by yeast hydrolysate. *Phytother Res*. 2011; 25(5): 716-23.
- 85- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004; 329(1): 77-84.