Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir
de 28/06/2024

UNESP - Universidade Estadual Paulista

"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Ana Flávia Balestrero Cassiano

Efeito pró-osteogênico da cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-5 em células pulpares humanas

Araraquara

2022

UNESP - Universidade Estadual Paulista

"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Ana Flávia Balestrero Cassiano

Efeito pró-osteogênico da cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-5 em células pulpares humanas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Faria

Araraquara

2022

C345e

Cassiano, Ana Flávia Balestrero
Efeito pró-osteogênico da cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-5 em células pulpares humanas / Ana Flávia Balestrero Cassiano. -- Araraquara, 2022
56 p. : il., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Gisele Faria

1. Cistatinas. 2. Catepsinas. 3. Células-tronco mesenquimais. 4. Diferenciação celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Flávia Balestrero Cassiano

Efeito pró-osteogênico da cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-5 em células pulpares humanas

Comissão Julgadora

Defesa de Dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Endodontia

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Gisele Faria

2º Examinador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

3º Examinador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Araraquara, 28 de junho de 2022

Dados Curriculares

Ana Flávia Balestrero Cassiano

Nascimento: 14 de abril de 1994 – Poços de Caldas, MG

Filiação: Carlos Antônio Cassiano
Araline Vallim Balestrero Cassiano

2013-2018 Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – FOAr UNESP – Araraquara - SP

2015-2015 Intercâmbio Internacional Estudantil
Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

2019-2019 Curso de aprimoramento em Cirurgia Oral Menor e Implantes
Prof. Dr. Aluisio Martins de Oliveira Ruellas em parceria com DSP Biomedical, Poços de Caldas – MG

2019-2020 Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia
Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas – SP

2020-2022 Curso de Pós-Graduação em Endodontia – Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – FOAr UNESP – Araraquara - SP

2021-Atual Curso de Especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – FOB USP/FUNBEO – Bauru - SP

Dedico este trabalho à minha irmã, **Fernanda**, e aos meus pais, **Carlos** e **Araline**. À minha irmã, obrigada por todo incentivo, suporte e conselhos, você é uma inspiração! Aos meus pais, sou grata por todo o esforço, apoio e abdicações, sem vocês não chegaria até aqui. A conclusão desta fase da minha vida é nossa!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Carlos** e **Araline**, e à minha irmã, **Fernanda**, apenas a dedicatória deste trabalho a vocês não é suficiente. Saibam que vocês são meu bem maior e espero estar honrando todas as expectativas e esforços, trazendo orgulho cada dia mais. Sei que este ainda é o começo de muitas conquistas que estão por vir! Amo muito vocês!

À minha orientadora, **Profa. Dra. Gisele Faria**, por ter me recebido como sua orientada e confiado no meu trabalho. Admiro muito a sua dedicação e disponibilidade em ensinar. A senhora é extremamente comprometida com o verdadeiro significado da palavra “professor” e sorte daqueles que têm docentes assim. Agradeço por ter exigido de mim sabendo o quanto eu seria capaz de produzir, mesmo muitas vezes eu duvidando de mim mesma. Hoje vejo o quanto evoluí nesse período e não poderia ser mais grata.

Ao meu melhor amigo nesse período, **Rodolfo**, que sempre foi prestativo, paciente e dedicado, sendo para mim um exemplo de força de vontade e determinação. Você é uma pessoa incrível que nunca mediu esforços para me ajudar quando precisei.

Agradeço muito meus amigos **Sâmmea Martins Vieira**, **Luana Raphael da Silva**, **Victor Manuel Ochoa Rodriguez** e **Eric Hernán Coaguila Llerena**, vocês são muito especiais e cada um (à sua maneira) contribuiu comigo nessa fase. **Sâmmea**, estivemos juntas desde o primeiro dia de disciplinas no mestrado, e desde lá eu soube que teria uma amiga para contar, desabafar e compartilhar momentos pessoais e profissionais; admiro o quanto você busca conhecimento e o seu interesse em aprender coisas novas (mesmo não fazendo parte da sua área de pesquisa), fico feliz por ter te ensinado um pouco sobre células e sou muito grata por ter me “socorrido” algumas vezes que precisei! Do mesmo modo, **Victor**, obrigada por toda sua ajuda, até mesmo nas partes “chatinhas” (leia-se: limpezas do laboratório) mas, brincadeiras à parte, você é um grande amigo e parceiro dentro e fora da faculdade! Desde a minha graduação, já sabia que a convivência com você seria leve e gratificante! **Hernán**,

você é um grande exemplo como pessoa/amigo e como profissional/estudante, sou muito grata por sua prestatividade e sua amizade! E por fim, **Luana**, aprendi muito com você nesse período e sei que pude te ensinar muito também, passamos juntas pelos “sufocos” e hoje sabemos o quanto evoluímos! Muito obrigada pela sua amizade dentro e fora da faculdade! Desejo a todos vocês um futuro brilhante!

No dia a dia dentro do laboratório tive companhias maravilhosas, a convivência com vocês me proporcionou uma troca de experiências e de conhecimentos valiosos que levarei para a vida. Destaco também, a **Natalia da Ponte Leguizamón**, que mesmo na correria do final do seu doutorado, se dispôs a me ensinar toda a base necessária para eu trabalhar com células, meu muito obrigada! Ainda, agradeço a oportunidade de coorientar as alunas de Iniciação Científica **Cíntia da Silva Santos** e **Isadora Passos Barbieri**, vocês são muito dedicadas e foi um prazer trabalhar com vocês.

Obrigada professor **Carlos Rossa Junior**, por abrir as portas do seu laboratório para a realização do nosso trabalho.

Obrigada a todos os **funcionários** e **servidores** envolvidos da **UNESP**, em especial a Faculdade de Odontologia de Araraquara, desde a Reitoria, Diretoria e Coordenadorias aos técnicos administrativos da limpeza que são essenciais para que tudo funcione da melhor maneira possível. Foi uma honra retornar ao lugar onde me graduei para fazer pós-graduação.

A todos os **professores** que ministraram suas disciplinas nesse período, e professores convidados, obrigada por todos os aprendizados, conselhos, e motivações, que levarei para a vida.

Agradeço ainda, aos meus colegas **Igor Paulino Mendes Soares** e **Fernanda Ali Kitagawa** que foram muito prestativos e me acompanharam em algumas análises no laboratório de trabalho deles. Aproveito a oportunidade para agradecer o professor Beto (**Carlos Alberto de Souza Costa**), que nos autorizou a utilizar alguns equipamentos do seu laboratório, saiba que foi muito importante para a concretização desta pesquisa.

Agradeço às Professoras **Ester Alves Ferreira Bordini** e **Josimeri Hebling Costa** pela participação como comissão examinadora do Exame de Qualificação deste trabalho. As considerações de vocês fortaleceram muito o desenvolvimento desta Dissertação.

Obrigada a todos os **familiares** e **amigos** que sempre estiveram ao meu lado apesar da distância, não citarei nomes pois são muitos, mas vocês sabem que são muito importantes para mim, e dão sentido a tudo!

Não menos importante, agradeço a **Deus**, pelas oportunidades, bênçãos, proteção e toda força para enfrentar todas as dificuldades. Ainda, por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho, fazendo tudo ficar mais fácil!

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.

Por fim, agradeço à **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/09576-6) pelo apoio financeiro (bolsa de estudo) essencial para realização dessa pesquisa.

“O homem cresce conforme a largura de suas intenções e míngua conforme a estreiteza de suas intenções. Deus inicia o homem, mas este tem de concluir a si mesmo”. Reverendo Charles H. Parkhust*

* Sant’anna A. Nunca foi sorte. São Paulo: Buzz Ed.; 2019.

Cassiano AFB. Efeito pró-osteogênico da cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-5 em células pulpares humanas [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O aumento da atividade de cisteína catepsinas (um grupo de cisteíno proteases) está relacionado ao desenvolvimento de doenças osteolíticas, como a osteoporose e a periodontite apical, por participarem da reabsorção óssea por meio da degradação proteolítica de componentes da matriz orgânica. As cistatinas são inibidores naturais e reversíveis de cisteíno proteases. As fitocistatinas são cistatinas de plantas, sendo que algumas delas já foram produzidas de forma recombinante, como a CaneCPI-5 (derivada da cana-de-açúcar), a qual é foco deste estudo por ter apresentado potencial pró-osteogênico observado em estudo preliminar do nosso grupo de pesquisa. O objetivo deste estudo foi avaliar a citocompatibilidade e o efeito da CaneCPI-5 sobre a proliferação, migração, diferenciação osteo/odontogênica de células-tronco mesenquimais da polpa dental humana (hDPSCs). As hDPSCs expostas à CaneCPI- 5 e não expostas (controle) foram avaliadas quanto à viabilidade por meio do ensaio de alamarBlue, proliferação pelo ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), migração por ensaio de *transwell*, deposição de precipitados inorgânicos pela coloração de vermelho de alizarina e quanto a atividade da enzima fosfatase alcalina tecidual inespecífica (TNAP). Os dados foram avaliados por ANOVA de uma ou duas vias, seguido do pós-teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, ou Mann Whitney, com $\alpha = 0,05$. A CaneCPI-5 foi citocompatível, induziu maior migração, proliferação, formação de nódulos mineralizados e atividade da TNAP em hDPSCs em relação ao controle. Assim, pode-se concluir que a CaneCPI-5 se constitui em molécula com potencial promissor para ser utilizada em terapias que visam o reparo/regeneração pulpar e periapical.

Palavras – chave: Cistatinas. Catepsinas. Células-tronco mesenquimais. Diferenciação celular.

Cassiano AFB. Pro-osteogenic effect of recombinant sugarcane cystatin, CaneCPI-5, on human dental pulp cells [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The increase in cysteine cathepsins activity (a group of cysteine proteases) is related to the development of osteolytic diseases, such as osteoporosis and apical periodontitis, as they participate in bone resorption through the proteolytic degradation of organic matrix components. Cystatins are natural and reversible inhibitors of cysteine proteases. Phytocystatins are plant cystatins, some of them have already been produced recombinantly, such as CaneCPI-5 (derived from sugarcane), which is the focus of this study because it showed pro-osteogenic potential observed in a preliminary study of our research group. The aim of this study is to evaluate the cytocompatibility and effect of CaneCPI-5 on proliferation, migration, osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs). hDPSCs exposed to CaneCPI-5 and unexposed (control) were evaluated for viability using the alamarBlue assay, proliferation by bromodeoxyuridine incorporation (BrdU) assay, migration by transwell assay, deposition of inorganic precipitates by alizarin red staining and tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) enzyme activity. Data were evaluated by one-way or two-way ANOVA, followed by Tukey or Kruskal-Wallis post-test and Dunn or Mann Whitney post-test, with $\alpha = 0.05$. CaneCPI-5 was cytocompatible, induced higher migration, proliferation, formation of mineralized nodules and TNAP activity in hDPSCs compared to control. Thus, it can be concluded that CaneCPI-5 constitutes a molecule with promising potential to be used in therapies that aim the pulp and periapical repair/regeneration.

Keywords: Cystatins. Cathepsins. Mesenchymal stem cells. Cell differentiation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 PROPOSIÇÃO 18

3 PUBLICAÇÃO 19
3.1 ARTIGO 19

4 CONCLUSÃO 38

REFERÊNCIAS 39

APÊNDICE.....44

ANEXO 51

1 INTRODUÇÃO

O processo de remodelação óssea tem sido amplamente estudado. Por ser um processo dinâmico, que envolve continuamente a reabsorção por osteoclastos e a deposição de matriz óssea por osteoblastos, é necessário que esses dois mecanismos estejam acoplados funcionalmente e quantitativamente, ou seja, que haja um equilíbrio entre reabsorção e neoformação[1]. Várias doenças envolvem desequilíbrio no processo de remodelação óssea com o predomínio de reabsorção, como a osteoporose, artrite, doença periodontal e periodontite apical[2-5]. O processo de reabsorção óssea envolve a degradação da matriz orgânica, pela ação de metaloproteases da matriz (MMPs) e cisteíno proteases, e a solubilização da parte mineral inorgânica, pela produção e bombeamento de prótons pelos osteoclastos, que tornam o microambiente ácido[6,7].

Cisteíno proteases são expressas em todos os organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, plantas e animais[8,9], e estão divididas em 82 famílias e 14 clãs[10]. A família das papaínas proteases ou C1, constitui uma das maiores e mais bem caracterizadas famílias de cisteíno proteases. Em mamíferos, um grupo de cisteíno proteases, denominado cisteína catepsinas, que são proteases lisossomais[2,11], desempenha papéis importantes em muitos processos fisiológicos como o processamento proteolítico de pró-hormônios e enzimas, degradação de proteínas, apresentação de antígenos, remodelação tecidual, inflamação, entre outros[12,13]. No sequenciamento do genoma humano (2003) foram descritas 11 cisteína catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W)[14].

As cisteína catepsinas podem ser prejudiciais quando estiverem desreguladas, com consequente superexpressão e secreção para o espaço extracelular. Um aumento da atividade das cisteína catepsinas pode ter importante papel em várias doenças, tais como osteoporose, osteoartrite, doença de Alzheimer e câncer, tornando-se, em algumas delas, alvos terapêuticos ou marcadores para o diagnóstico e avaliação da progressão dessas condições[2,12,13].

A catepsina K está diretamente envolvida no processo de reabsorção óssea, sendo altamente expressa pelos osteoclastos, além de participar da indução da diferenciação osteoclástica[15,16]. Ela degrada o colágeno tipo I, desencadeando a destruição tecidual[17], e representa 98% da atividade das cisteíno proteases ósseas[7].

Na Odontologia, a catepsina K está envolvida na patogênese de doenças como cárie, doença periodontal e periodontite apical[4,5,18,19]. 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[3]. A inibição da catepsina K, por meio do uso de inibidores sintéticos como Odanacatib (Selleckchem, EUA) ou NC-2300 (Nippon Chemiphar Co Ltd, Saitama, Japão), reduziu a reabsorção óssea pela inibição da função dos osteoclastos e da síntese de mediadores inflamatórios, diminuindo a expansão da lesão periapical em ratos, sugerindo que inibidores de catepsina K poderiam ser utilizados no tratamento da periodontite apical[4,20].

As cistatinas são inibidores naturais e reversíveis de cisteíno proteases. Elas atuam por meio de inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica das cisteína catepsinas[21]. Em humanos, elas têm um papel crítico no controle da degradação de proteínas, sendo que o descontrole pode resultar em processos patológicos como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, osteoporose, osteoartrite, artrite reumatoide e reabsorção óssea[2]. As cistatinas, principalmente as inibidoras da catepsina K, constituem uma classe emergente de fármacos que são potentes antagonistas da atividade osteoclástica, reduzindo a perda óssea[22], por exemplo, em casos de osteoporose[23]. No entanto, apesar de vários fármacos inibidores de catepsina K terem tido bons resultados iniciais para o tratamento da osteoporose e artrite, nenhum deles entrou em uso clínico até o momento, e poucos estão em estudo em humanos. A razão mais conhecida para isso é a toxicidade, que se tornou evidente após o tratamento a longo prazo. Isso foi demonstrado no caso de Odanacatib (Merck), que teve muito sucesso nos estágios pré-clínicos e até concluiu com sucesso os ensaios clínicos de fase III. No entanto, estudos prolongados mostraram efeitos adversos relacionados a acidente vascular encefálico, o que levou à sua descontinuação[13]. Por outro lado, alternativas homólogas são necessárias e devem ser pesquisadas[24].

Além da inibição das cisteína catepsinas, alguns estudos têm mostrado que as cistatinas podem apresentar efeito pró-osteogênico. Danjo et al.[25] trataram com cistatina C (CysC; BioVender Laboratory Medicine, Brno, Czech Republic) células da medula e da calvária de camundongos, e observaram elevada expressão do mRNA da proteína morfogenética óssea -2 (BMP-2) e do fator de transcrição relacionado à Runt-2 (RUNX2), além do aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), mineralização da matriz óssea e formação de osso da calvária de camundongos. Um

inibidor de catepsina K (MV061194 - Medivir UK Ltd., Little Chesterford, Essex, UK) suprimiu a degradação de fatores de crescimento como a BMP-2 da matriz orgânica, com consequente aumento da formação óssea[26]. Mais recentemente, Yasueda et al.[27] estudaram a influência da CysC, presente na proteína básica do leite, sobre a reabsorção óssea e sobre células osteoblásticas de camundongo (MC3T3-E1), e concluíram que a CysC teve um efeito positivo sobre o metabolismo, não apenas inibindo a reabsorção óssea pelos osteoclastos, mas também estimulando a proliferação de pré-osteoblastos MC3T3-E1.

As cistatinas fazem parte de um grupo denominado “superfamília cistatina” que apresentam semelhanças em suas sequências e funções de aminoácidos[28]. Esse grupo é subdividido em 4 famílias, sendo 3 de origem animal e uma derivada de plantas, as chamadas fitocistatinas[29]. As cistatinas das famílias 1, 2 e 3 estão presentes no corpo humano intracelularmente ou distribuídas nos tecidos, fluidos e plasma sanguíneo[30-32]. As fitocistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno proteases que são encontradas naturalmente em diversas plantas, principalmente em angiospermas como o arroz, milho, soja, laranja e cana-de-açúcar[33-38]. Elas são proteínas pequenas, com massa molecular de aproximadamente 12-16kDa[39], e têm capacidade de inibir enzimas da classe C1A ou papaínas[40]. As fitocistatinas regulam a atividade das proteases endógenas de plantas, estando envolvidas no desenvolvimento das mesmas, além de desempenharem papel de defesa em resposta as peptidases exógenas de insetos herbívoros, patógenos e nematoides, bem como em condições de estresse[9,24,32,37].

Novas fitocistatinas podem ser indentificadas através dos bancos de ESTs (expressed sequence tag). Cistatinas da cana-de-açúcar foram descritas pela primeira vez em 2001[32]. Por meio do projeto genoma da cana-de-açúcar foram identificados 25 *clusters* para fitocistatinas, as quais foram denominadas canacistatinas. A primeira fitocistatina derivada da cana-de-açúcar produzida de forma recombinante, foi denominada CaneCPI-1, com expressão de aproximadamente 15kDa em *Escherichia coli*[33], e se mostrou capaz de inibir as catepsinas humanas B, K, L e V[8]. Atualmente existem seis cistatinas recombinantes derivadas da cana-de-açúcar: CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4, CaneCPI-5 e Cane-CPI-6[9,24,38,41,42]. CaneCPI-2 e CaneCPI-3 apresentaram atividade inibitória contra a papaína[9], sendo que a CaneCPI-3 também foi capaz de inibir a legumaína[43]. A CaneCPI-4 mostrou inibição das catepsinas humanas B e L, além de reduzir significantemente a capacidade

invasiva de células de câncer de mama, inibir o crescimento de melanoma, diminuir a angiogênese in vitro e in vivo e a metástase tumoral[41,44], o que demonstra o potencial das fitocistatinas para aplicações terapêuticas na área médica[24].

Mais recentemente, foi mostrado o potencial para uso odontológico de fitocistatinas recombinantes. Santiago et al.[24] caracterizaram, realizaram a produção heteróloga da Canacistatina 5 recombinante (CaneCPI-5) e mostraram que ela é um inibidor potente das catepsinas humanas B, K e L. Durante os ensaios, foi observada forte aderência da CaneCPI-5 às cubetas de quartzo, o que levou à hipótese de que a mesma poderia aderir-se ao esmalte dental e proteger contra a erosão. Na sequência, o estudo mostrou que a CaneCPI-5 interagiu fortemente com o esmalte dental (em comparação com mucina e caseína) e reduziu significativamente a erosão inicial frente aos desafios ácidos. Ainda, in vitro, outro estudo mostrou em esmalte de dentes naturais humanos, que a interação da CaneCPI-5 com a película adquirida também preveniu erosão dentária[45]. In vivo, o tratamento com a CaneCPI-5 aumentou consideravelmente as proteínas ácido-resistentes na película adquirida do esmalte e, frente ao desafio ácido, liberou menor quantidade de íons cálcio do esmalte em comparação com o grupo não tratado[46]. Os autores destes estudos sugeriram que a inclusão de CaneCPI-5 em produtos dentários poderia ser interessante para conferir proteção contra a erosão dental, além de ser uma opção de baixo custo. Com relação aos efeitos sobre biofilme e anticárie de esmalte, a CaneCPI-5 também apresentou resultados favoráveis, sendo semelhante à clorexidina[47]. No entanto, em outro estudo, embora ela tenha reduzido significantemente a viabilidade do biofilme microcosmo de saliva humana/McBain, isto não refletiu no seu potencial anticárie[48]. Sobre a dentina, a CaneCPI-5 não alterou as características e a viabilidade do biofilme microcosmo de saliva humana/McBain e não foi capaz de reduzir significativamente a desmineralização[49].

Em uma outra abordagem, a CaneCPI-5 foi capaz de atenuar o processo inflamatório induzido por um implante de esponja subcutânea em camundongos e favoreceu a angiogênese e a fibrinogênese, mecanismos importantes para o reparo tecidual[50].

Além da CaneCPI-5, o nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a cistatina recombinante derivada da *Citrus sinensis* ou laranja doce, denominada C*sin*-CPI2. Ela foi capaz de inibir a atividade e a expressão gênica das catepsinas humanas B e K, e apresentou potencial anti-inflamatório in vitro e in vivo[36]. Em outro estudo mais

recente, a C*sin*-CPI2, empregada sistemicamente, preveniu a perda óssea induzida pela doença periodontal em camundongos, por meio da redução da inflamação e da osteoclastogênese[51]. Além disso, a C*sin*CPI-2 apresentou efeito pró- osteogênico em células pulpares humanas (hDPCs), mostrado pelo aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de nódulos mineralizados e expressão gênica dos marcadores osteogênicos, BMP-2, RUNX2, ALP, osteocalcina e sialoproteína óssea[36]. Para compreender melhor esse efeito pró-osteogêncio, nosso grupo de pesquisa expôs pré-osteoblastos MC3T3-E1 à C*sin*CPI-2, e avaliou fenômenos de adesão, proliferação e diferenciação celular. Os resultados mostraram que nas primeiras horas de tratamento, a proteína C*sin*CPI-2 promoveu aumento da expressão de marcadores de adesão, que diminuem após 24 horas, levando à ativação de ciclinas dependentes de quinase (CDKs), modulando a transição de G1 a S fases do ciclo celular. Além disso, vimos que o aumento da ERK pode estar associado à ativação do perfil de diferenciação, também observado com aumento da via da β-catenina e aumento da expressão de RUNX2 no grupo que recebeu o tratamento com C*sin*CPI-2[52].

A reparação pulpar, periapical e a regeneração endodôntica envolvem processos de proliferação, migração para o local da lesão e diferenciação das 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 mineralizado[53-55]. Portanto, a capacidade de induzir a diferenciação celular osteo/odontogênica é uma das características desejáveis de materiais para serem utilizados em tratamento que visem o reparo do complexo dentino-pulpar e periapical[56,57].

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram potencial efeito pró- osteogênico da CaneCPI-5; pré-osteoblastos MC3T3-E1 tratados com a CaneCPI-5 tiveram expressão gênica elevada de marcadores relacionados à diferenciação osteogênica/mineralização, como a BMP-2, RUNX2 e ALP.

A identificação de substâncias bioativas para a diferenciação osteoblástica e/ou odontoblástica de células-tronco mesenquimais é um grande desafio para fomentar futuros tratamentos para reparação pulpar e periapical bem como para regeneração endodôntica[58]. Considerando o potencial das fitocistatinas de induzir fenótipo osteogênico[36], bem como os nossos resultados preliminares mostrando efeito altamente positivo da CaneCPI-5 na performance de pré-osteoblastos, torna-se

importante estudar o efeito osteogênico da CaneCPI-5 sobre células-tronco mesenquimais da polpa dental humana (hDPSCs).

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a CaneCPI-5 foi citocompatível, induziu proliferação e migração celular, bem como o desenvolvimento de fenótipo osteo/odontogênico em hDPSCs. Considerando esses efeitos, a CaneCPI-5 pode ser uma molécula promissora para aplicações biotecnológicas, favorecendo a regeneração/reparação pulpar e periapical. No entanto, ensaios em nível molecular são necessários para conhecer mais profundamente o seu efeito em células-tronco mesenquimais e, posteriormente, ensaios para determinar se os efeitos benéficos observados in vitro favorecem o reparo in vivo.

REFERÊNCIAS*

1. Szulc P. Bone turnover: biology and assessment tools. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2018; 32(5): 725-38.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. Science. 1989; 245(4920): 855-57.
7. Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. Biochem Cell Biol. 1996; 74(6): 759-75.
8. 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.
9. 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.
10. Kędzior M, Seredyński R, Gutowicz J. Microbial inhibitors of cysteine proteases. Med Microbiol Immunol. 2016; 205(4), 275–96.
11. Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. Nucleic acids Res. 2006; 34 (Database issue): D270-72.
12. Kramer L, Turk D, Turk B. The future of cysteine cathepsins in disease management. Trends Pharmacol Sci. 2017; 38(10): 873-98.
13. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B. Cysteine Cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. Cells. 2019; 8(3): 264.
14. Rossi A, Deveraux Q, Turk B, Sali A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. Biol Chem. 2004; 385(5): 363-72.
15. Laitala-Leinonen T, Rinne R, Saukko P, Väänänen HK, Rinne A. Cystatin B as an intracellular modulator of bone resorption. Matrix Biol. 2006; 25(3): 149-57.

* 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

16. 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.
17. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W 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.
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. JEndod. 2010; 36(2): 244-50.
19. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. J Dent Res. 2011; 90(4): 506-11.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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): 200-11.
27. 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.
28. Barret AJ, Rawlings ND, Cavies ME, Machleidt W, Salvesen G, Turk V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin super family. In: Barrett AJ, Salvesen G, editors. Proteinase inhibitors. Amsterdam: Elsevier; 1986. p. 515-69.
29. Margis R, Reis EM, Villeret V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. Arch Biochem Biophy. 1998; 359(1): 24-30.

30. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS Letters. 1991; 285(2), 213-9.

31. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczk W et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. Acta Biochim Pol. 2001; 48(1): 1-20.

32. Reis EM, Margis R. Sugarcane phytocystatins: identification, classification and expression pattern analyses. Gen Mol Biol. 2001; 24(1-4): 291-6.

33. Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique –Silva F. A sugar cane cystatin recombinant expression, purification, and antifungal activity. Biochem. Biophy. Res. Commun. 2002; 296(5): 1194-9.

34. Oliveira AS, Xavier-Filho J, Salles MP. Cysteine proteinases and cystatins. Brazilian Archieves. 2003; 46(1): 91-104.

35. Udenigwe CC. Towards rice bran protein utilization: in silico insight on the role of oryzacystatins in biologically-active peptide production. Food Chem. 2016 Jan.; 191: 135-38.

36. 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 Nov.; 123: 154760.

37. Schneider VK, da Silva Ferrara TF, Rocha SV, Santos-Júnior CD, Neo-Justino DM, da Cunha AF et al. Recombinant expression, characterization and phylogenetic studies of novels cystatins-like proteins of sweet orange (Citrus sinensis) and clementine (Citrus clementina). Int J Biol Macromol. 2020 Jun; 152: 546-53.

38. 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 Jan; 167: 676-86.

39. 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): 1747.

40. Tremblay J, Goulet MC, Michaud D. Recombinant cystatins in plants. Biochimie. 2019 Nov.; 166: 184-93.

41. 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.

42. 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.

43. Santos-Silva LK, Soares-Costa A, Gerald LT, Meneghin SP, Henrique-Silva F. Recombinant expression and biochemical characterization of sugarcane legumain. Plant Physiol Biochem. 2012 Aug; 57: 181– 92.

44. 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.

45. Pelá VT, Buzalaf MAR, Niemeyer SH, Baumann T, Henrique-Silva F, Toyama D et al. Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: mechanism of action on native human enamel surface. J Dent. 2021 Apr; 107: 103612.

46. Carvalho TS, Araújo TT, Ventura TMO, Dionizio A, Câmara JVF, Moraes SM et al. Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. J Dent. 2020 Nov; 102: 103478.

47. Araujo TT, Camiloti GD, Valle AD, Silva NDG, Souza BM, Carvalho TS et al. A sugarcane cystatin (CaneCPI-5) alters microcosm biofilm formation and reduces dental caries. Biofouling. 2021; 37(1): 109-16.

48. Pelá VT, Braga AS, Camiloti GD, Lunardelli JGQ, Pires JG, Toyama D et al. Antimicrobial and anti-caries effects of a novel cystatin from sugarcane on saliva-derived multi-species biofilms. Swiss Dent J. 2021; 131(5): 410-6.

49. Frazão Câmara JV, Araujo TT, Mendez DAC, da Silva NDG, de Medeiros FF, Santos LA et al. Effect of a sugarcane cystatin on the profile and viability of microcosm biofilm and on dentin demineralization. Arch Microbiol. 2021; 203(7): 4133-9.

50. Ferreira BA, Toyama D, Henrique-Silva F, Araújo FA. Recombinant sugarcane cystatin CaneCPI-5 down regulates inflammation and promotes angiogenesis and collagen deposition in a mouse subcutaneous sponge model. Int Immunopharmacol. 2021 Jul; 96: 107801.

51. 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): 216-25.

52. 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.

53. 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.

54. 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.

55. 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.

56. 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.

57. 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.

58. 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.