



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}.

2 PROPOSIÇÃO

Considerando o potencial das cistatinas de induzir fenótipo osteogênico²⁷, o objetivo deste estudo foi avaliar a citocompatibilidade e o efeito da fitocistatina *CsinCPI-2* sobre a proliferação, migração e diferenciação osteogênica de células da polpa dental humana (hDPCs).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A proteína recombinante *CsinCPI-2* derivada da *Citrus sinensis* (laranjeira que produz a laranja doce) foi produzida no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A *CsinCPI-2* foi aplicada em cultura primária de células da polpa dental humana (hDPCS) e foram avaliados viabilidade celular por meio dos ensaios de Alamar Blue e MTT, apoptose por citometria de fluxo, atividade de fosfatase alcalina por meio do cálculo da liberação de timolftalínea, produção de nódulos mineralizados por vermelho de alizarina, migração celular por meio do ensaio de *transwell*, proliferação por meio de ensaio imunoenzimático de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e expressão de genes relacionados a osteogênese (BMP-2, RUNX2, ALP, BSP, OC e DMP-1) por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

3.1 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante *CsinCPI-2*

Para a produção heteróloga da *CsinCPI-2* recombinante, foi utilizada a cepa bacteriana *Escherichia coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo pET28a- *CsinCPI-2*. As bactérias contendo o plasmídeo *CsinCPI-2* foram cultivadas em meio líquido LB Broth (USB) na presença de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,4mM, para indução da expressão da proteína. Após esta etapa, a proteína foi purificada em cromatografia de afinidade utilizando coluna contendo resina de níquel Ni-NTA (QIAGEN, Germantown, MD, USA). Para eluição da proteína foram utilizadas concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100, e 250 mM). As amostras de proteína obtidas após a indução da expressão e purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%. A concentração de proteína foi determinada usando o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e a mesma foi mantida em freezer a -20°C até sua utilização.

3.2 Cultura Celular

As culturas de hDPCs utilizadas neste estudo foram estabelecidas a partir de terceiros molares após a aprovação do comitê de ética em pesquisa em seres humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP - FOAr (CAAE: 90278518.6.0000.5416). As células foram provenientes de terceiros molares de três pacientes saudáveis (16 a 25 anos), indicados para a extração por motivos ortodônticos. As culturas de células foram estabelecidas usando o método de dissociação enzimática⁵⁰. Resumidamente, os tecidos periodontais foram removidos, os dentes foram desinfetados, envolvidos com gaze, inseridos em pacotes de plástico esterilizados

e fraturados com auxílio de martelo. Em seguida, o tecido pulpar foi removido, transferido para microtubo de 2 mL (Axygen®, Corning, New York, NY, USA) contendo solução salina tamponada de fosfato (PBS 1X) e picotado em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura estéril. O microtubo contendo a polpa foi centrifugado a 400g por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 mL de colagenase tipo I (Worthington, Vassar Ave, Lakewood, EUA) na concentração de 3 mg / mL. Esta solução permaneceu em contato com a polpa por 1 hora a 37 ° C, sendo que a cada 15 minutos foi realizada agitação de 5 segundos em vórtex. Então, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, repetindo a centrifugação a cada lavagem e foram cultivadas em placa de petri (0,40 x 11mm, Corning, New York, NY, USA), contendo meio de cultura *α-minimum essential medium* (α -MEM , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino - SBF (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma – Aldrich) em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Após atingirem confluência de 80%, as células foram transferidas para uma garrafa de cultura celular de 75 cm² de área de crescimento celular (Corning). Para realização dos ensaios foram utilizadas células da 3^a a 6^a passagem que foram cultivadas em placas de 96, 24, 12 ou 6 poços (Corning), contendo α -MEM com FBS 10% por 24h. O meio α -MEM não osteogênico foi utilizado como controle. Para o ensaio do vermelho de alizarina foi utilizado o meio osteogênico, obtido a partir da suplementação do α -MEM com 50 µg / mL de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich) e β -glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich). Todos os ensaios foram realizados pelo menos duas vezes empregando de triplicata a sextuplicata, com células de três doadores na forma de “pool”.

3.3 Caracterização Imunofenotípica das Culturas de hDPCs

A cultura de hDPCs foi avaliada por meio de citometria de fluxo utilizando os marcadores de células tronco mesenquimais (CD146, CD90, CD105, CD73) e hematopoiéticas e/ou endoteliais (CD45, CD34), como descrito previamente⁵¹. As hDPCs na terceira passagem foram cultivadas em placas de 24 poços (1x10⁶ células/mL) e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram lavadas com PBS (sem cálcio - Ca e magnésio – Mg), incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente com 300µL/poço de detergente não enzimático (Gibco), coletadas da placa de cultura, transferidas para um tubo de 2mL (Axygen®, Corning) e lavadas com PBS gelado (sem Ca e Mg). Em seguida, o pellet foi ressuspensionado com 100µL de *stain buffer* (2% de bovine serum

albumin – BSA em PBS) e as células foram incubadas com os anticorpos mouse anti-human conjugados com os fluorocomas: CD146-PE (phycoerythrin), CD90-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD105-FITC, CD73-PE, CD45-PE e CD34-FITC seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA, USA). Após incubação com as combinações de dois anticorpos com fluorocomas diferentes em cada tubo por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspensionado com 100µL de *stain buffer*. As células foram analisadas em separador de células ativado por fluorescência - Facs (BD Biosciences FACS Verse 4C, Pharmingen).

3.4 Avaliação da Viabilidade/Metabolismo Celular por Ensaio de MTT

O ensaio de viabilidade celular é baseado na atividade da enzima mitocondrial desidrogenase em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazol) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células viáveis/metabolicamente ativas⁵². As hDPCs foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (2×10^5 células/mL). Após 24 horas, as células foram expostas a diferentes concentrações da CsinCPI-2 (1,83 µM; 3,73 µM; 7,47 µM; 11,20 µM e 16,60 µM), meio de cultura α-MEM (controle negativo) e ao o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma/ Aldrich) na concentração de 20% (controle positivo), por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 100µl da solução de MTT (Sigma/ Aldrich) a 0,5mg/mL, sendo as células incubadas por 4 horas em estufa 5% de CO₂, 95% de umidade à 37°C. Após este período adicionou-se 100µL álcool isopropílico acidificado (HCl: 0,04N) ao extrato para solubilizar os cristais de formazan. As densidades ópticas das soluções foram medidas em espectrofotômetro com filtro de 570 de comprimento de onda (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada comparando a absorbância das células tratadas com cada concentração da CsinCPI-2 com o controle negativo (células não tratadas).

3.5 Avaliação da Viabilidade por Ensaio de Alamar Blue

O ensaio de alamar blue é baseado na incorporação da resazurina, composto ativo do reagente alamar blue, pelas células viáveis. A resazurina incorporada é reduzida a resorufina, que é um composto vermelho e altamente fluorescente, cuja fluorescência correlaciona-se com a atividade metabólica e a viabilidade das células⁵³. Vinte e quatro horas após o plaqueamento

das hDPCs (2×10^5 células/mL) em placas de cultura de 96 poços, elas foram expostas à CsinCPI-2 nas concentrações de 1,83 μ M; 3,73 μ M; 7,47 μ M; 11,20 μ M e 16,60 μ M, meio de cultura α -MEM (controle negativo) e ao o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma/ Aldrich) na concentração de 20% (controle positivo), por 24 horas. Após esse período, 120 μ L de uma solução de alamar blue a 10% (Thermo Fisher Scientific) foi adicionada em cada poço e as células foram incubadas por 4 horas. Em seguida, 100 μ L de cada poço foram colocados em outra placa para realização da leitura em espectrofotômetro VERSAmax (Molecular Devices LLC, San Jose, CA, USA) nos comprimentos de onda de 570 e 600nm. Os cálculos foram realizados por meio da subtração da leitura de 570nm e 600nm e posteriormente foi realizado a porcentagem de redução de rezasurina.

3.6 Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

O ensaio de atividade de ALP foi realizado empregando o Kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As hDPCs foram plaqueados (7×10^4 células/mL) em placas de 96 poços e incubados por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com a CsinCPI-2 nas concentrações de 1,83 μ M; 3,73 μ M; 7,47 μ M; 11,20 μ M e 16.60 μ M, e com o meio de cultura α -MEM (controle negativo) nos períodos de 1, 3, 7 e 14 dias. Após cada período, as células foram lavadas com PBS (100 μ L / poço) e incubadas com 200 μ L de solução de lauril sulfato de sódio (SDS, 1mg/ml) por 30 minutos em temperatura ambiente. Microtubos de 2 mL (Axygen®, Corning) foram identificados, sendo 1 tubo para o padrão, 1 tubo para o branco e os demais para as amostras em triplicada. Os tubos estes foram preenchidos com os reagentes do kit, reagente 1 (substrato), reagente 2 (tampão) e reagente 4 (padrão) e incubados em banho maria (37°C) por 2 minutos. Após esse período, foi adicionado 0,05 μ L das amostras nos respectivos tubos, exceto no branco e no padrão, e estes foram novamente incubados em banho maria a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 μ L do reagente 3 (reagente de cor) em todos os tubos e alíquotas de 100 μ L foram transferidas para placa de 96 poços. A densidade óptica das soluções foram medidas por espectrofotômetro com filtro de 590 nm de comprimento de onda (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000), e a atividade da ALP foi calculada como μ mol de timolftaleína/min/L/OD. Os dados foram expressos como atividade da ALP normalizada pelas células viáveis nos respectivos períodos (OD = 570 nm) determinado no ensaio de MTT que foi realizado concomitantemente ao ensaio de atividade de ALP⁵⁴.

Com base nos resultados da atividade de ALP induzida pelas diferentes concentrações da CsinCPI-2, foi escolhida uma única concentração (3,73 μ M) para realização dos demais experimentos.

3.7 Análise de Apoptose por Citometria de Fluxo

A avaliação de apoptose foi realizada empregando-se anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI). A anexina V conjugada com a fluoresceína é usada para quantificação de células apoptóticas por se ligar a fosfolípídeos da membrana plasmática carregados negativamente como a fosfatidilserina. As células apoptóticas mantêm a integridade da membrana plasmática durante a maior parte do processo de apoptose e se torna permeável ao PI durante a necrose secundária à apoptose⁵⁵. As hDPCs foram cultivados na densidade de 1x10⁶ células/mL em placas de cultura de 24 poços e incubadas com a CsinCPI-2 na concentração de 3,73 μ M e controles (α -MEM e peróxido de hidrogênio - 1mM). Após 24 horas as células foram coletadas com uso do *cell dissociation buffer Enzyme-Free Hank's based* (Gibco), centrifugadas e ressuspendidas em tampão de ligação, de acordo com as instruções do fabricante (FITC Annexin V Apoptosis detection Kit I, BD Biosciences, Pharmingen). A suspensão de células (100 μ l) foi incubada com 3 μ l de FITC Annexin e de PI por 15 minutos a temperatura ambiente sem o contato com a luz. Em seguida, as células foram examinadas em um separador celular ativado por fluorescência - FCAS (BD Biosciences FACS Verse 4C, Pharmingen). Os resultados foram avaliados de acordo com os parâmetros: células viáveis (FITC-/PI-); apoptose inicial (FITC+/PI-); apoptose final (FITC+/PI+) e, necrose (FITC-/PI+). Para análise estatística e representação dos resultados as porcentagens de células em apoptose final e necrose foram somadas, e os resultados foram apresentados como células viáveis, em apoptose e em necrose.

3.8 Ensaio de Coloração com Vermelho de Alizarina

Com a finalidade de identificar e quantificar depósitos de cálcio, foi realizada a técnica de coloração com vermelho de alizarina. As hDPCs foram plaqueadas (1x10⁴ células/mL) em placas de cultura de 24 poços. Durante 14 dias, as células foram expostas a CsinCPI-2 a 3,73 μ M e ao controle (meio de cultura α -MEM osteogênico), os quais foram renovados a cada 48 horas. Ao final de 14 dias, o meio foi aspirado, os poços foram lavados com PBS e as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C por 1 hora. As monocamadas celulares foram, então, lavadas duas vezes com água destilada e foram adicionados a cada poço 0,3 mL de vermelho de alizarina (Sigma – Aldrich) a 40 mM (2% - pH 4,1). Após incubação em temperatura ambiente por 2 minutos, os corantes foram removidos e os poços foram lavados 4 vezes com 1 mL de água destilada/poço. Em seguida, foram aplicados 500 μ L da solução de cloreto de

cetilpiridínio a 10% (Sigma/Aldrich) em cada poço, sendo a placa com o substrato incubada por 15 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Três alíquotas de 100 µL da ressuspensão de cada poço foram transferidas para placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000). Os resultados foram representados como densidade ótica obtida na leitura. Simultaneamente, em outra placa, foram realizados os mesmos tratamentos mencionados acima (indução, lavagem, coloração), e as placas foram deixadas anguladas por 2 minutos, para facilitar a remoção do excesso de água. Em seguida, foram adquiridas imagens em microscópio de luz convencional Leica-DM 2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), empregando aumento original de 10X.

3.9 qPCR

Para avaliação da expressão de genes relacionados à mineralização, as hDPCS foram plaqueadas (2×10^5 células/mL) em placas de cultura de 12 poços. As células foram expostas à CsinCPI-2 a 3,73 µM e ao meio de cultura α -MEM (controle) durante 1, 3, 7 e 14 dias. Para extração do RNA, foi utilizado o método que combina o uso do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguido da utilização parcial do Kit de extração Illustra™ RNAspin Mini (GE Healthcare, little Chalfont, UK). A concentração e qualidade das amostras de RNA total foram verificadas no aparelho Nanodrop (GE Healthcare). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado empregando 0,5 µg de RNA total usando o Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A expressão gênica foi analisada por meio de qPCR, utilizando o sistema “TaqManAssay” (Applied Biosystem, Life Technologies, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções da empresa. Foram utilizados os *primers* para proteína óssea morfogenética-2 - BMP-2 (Hs00154192_m1), osteocalcina - OC (Hs01587814_g1), fosfatase alcalina - ALP (Hs01029144_m1), sialoproteína óssea - BSP (Bt03212717_g1), runt-related transcription factor 2 - RUNX2 (Hs01047973_m1), proteína da matriz da dentina - DMP-1 (Hs01009391_g1) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH (Hs02758991_g1), todos da Applied Biosystems. Análises dos transcritos foram realizadas no aparelho *Step One Sequence Detection System* (Applied Biosystems). As taxas acumuladas de fluorescência foram analisadas pela curva de melting (Applied Biosystem) e a taxa de expressão dos genes alvos foi padronizada pelo gene GAPDH. Para comparar as taxas de expressão do mRNA de cada amostra, foi utilizado o método $\Delta\Delta C_t$ (fold expression = $2^{- (\Delta\Delta C_t \pm \text{stdev})}$). O ensaio foi realizado em triplicata.

3.10 Ensaio de Proliferação Celular

Para a avaliação da proliferação celular foi empregado o ensaio imunoenzimático de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) por meio do uso do kit ELISA (Roche GmbH, Heidelberg, Alemanha) de acordo com Heng et al.⁵⁶. As hDPCs foram plaqueadas (2×10^4 cel/poço) em placas de 96 poços e foram incubadas com a CsinCPI-2 a $3,73 \mu\text{M}$ e com o meio de cultura (controle) por 24 horas. Após esse período, 10 μL da solução de BrDU foram adicionados em cada poço contendo 100 μL de meio de cultura e as células foram incubadas a 37°C por 8 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido, foram aplicados 200 μL /poço do fixador do kit (FixDenat, Roche GmbH) e as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente para fixação e desnaturação do DNA simultaneamente. Este procedimento melhora a detecção posterior do BrDU pelo o anticorpo. Então, as células foram incubadas com o anticorpo para BrDU (1:100, 100 μL por poço) por 90 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo foi removido e foram adicionados 100 μL /poço da solução de substrato (5 minutos em temperatura ambiente). A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 370 nm em leitor de microplaca (Asys UVM 340, Cambridge, Londres, UK).

3.11 Ensaio de Migração Celular por *Transwell*

A capacidade da CsinCPI-2 ($3,73 \mu\text{M}$) de induzir a migração celular foi avaliada por meio do ensaio de *transwell* com poro de tamanho de $8 \mu\text{m}$ (Corning). As hDPCs, cultivadas em garrafas para cultura, foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio α -MEM com 0,5% de SFB e “plaqueadas” no compartimento superior da *transwell* (200 μL da suspensão de células na densidade de 3×10^5 cel/mL. O compartimento inferior foi preenchido com 600 μL de meio α -MEM com CsinCPI-2 ($3,73 \mu\text{M}$) ou SFB 10% (controle). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS, sendo àquelas que permaneceram na superfície superior da membrana (compartimento superior) removidas com auxílio de um cotonete. Foi realizada nova lavagem com PBS e as células que ultrapassaram a membrana e ficaram na face inferior da mesma (compartimento inferior) foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, as células foram coradas com Hoestch (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) por 15 minutos ao abrigo da luz. Cinco campos por *transwell* foram selecionados ao acaso para realizar análise quantitativa da migração celular pela contagem dos núcleos celulares em microscópio de fluorescência (EVOS F1 microscope, AMC, Bothell, WA, USA).

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio do software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), com nível de significância de 5%. Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância (ANOVA) de um fator e pós-teste de Tukey, ANOVA de dois fatores e pós-teste de Bonferroni ou teste t.

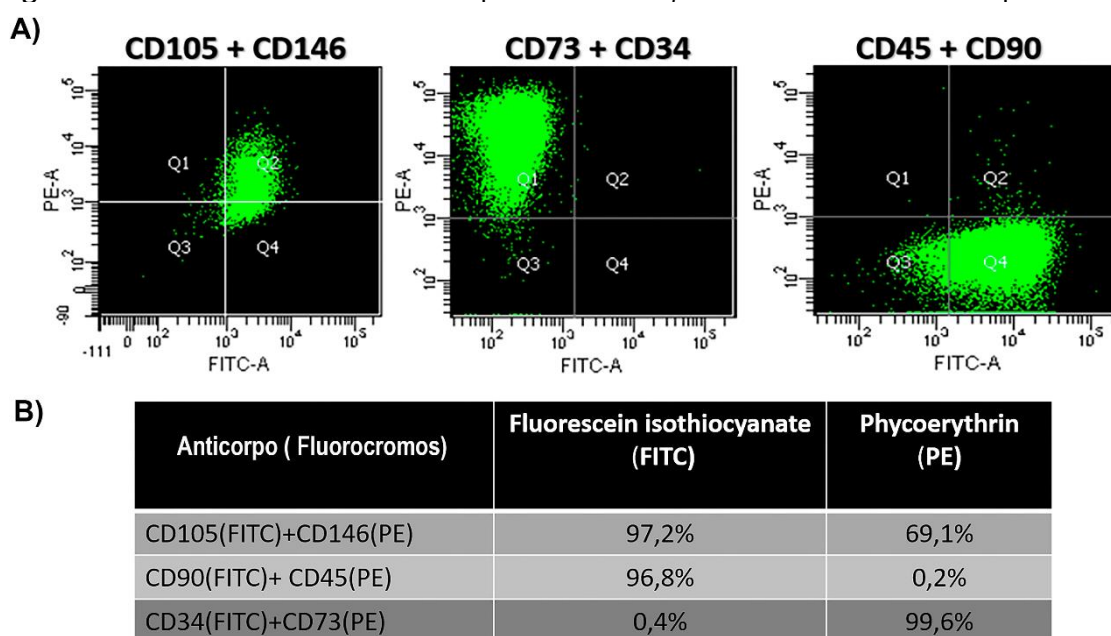
4 RESULTADOS

O resultado foi descrito de acordo com cada ensaio realizado.

4.1 Caracterização Imunofenotípica de Culturas de hDPCs

As culturas de hDPCs utilizadas neste estudo expressaram marcação para células tronco mesenquimais CD105 (97,2%), CD90 (96,8%), CD73 (99,6%) e CD146 (69,1%). Por outro lado, houve baixa porcentagem de expressão para marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais CD45 (0,2%) e CD34 (0,4%), como mostrado na figura 1.

Figura 1 - Ensaio de citometria de fluxo para caracterização de células tronco mesenquimais



Marcação de células tronco mesenquimais (CD146, CD105, CD90, CD73), hematopoiéticas e endoteliais (CD45 e CD34) em cultura de células da polpa dental humana. (A) Histogramas representativos de citometria de fluxo dos marcadores conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). (B) Tabela de marcadores com os respectivos fluorocromos e porcentagens de marcação.

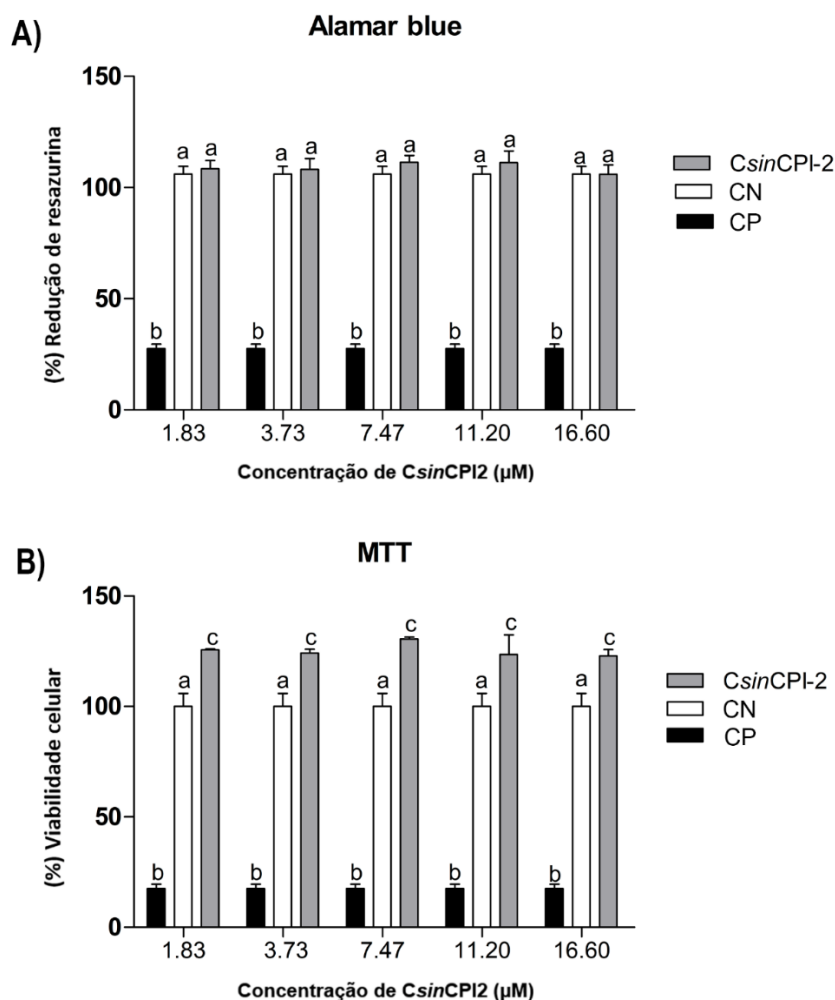
Fonte: Elaboração própria

4.2 Viabilidade Celular

Os ensaios de viabilidade celular alamar blue e MTT revelaram que a *CsinCPI-2* em contato com as hDPCs por 24 horas não teve efeito citotóxico nas concentrações estudadas. No ensaio de alamar blue (2A), não houve diferença significativa na viabilidade celular nas concentrações estudadas quando comparadas com o controle negativo ($P > 0,05$). No ensaio de MTT (2B), a viabilidade das células tratadas com a *CsinCPI-2* em todas as concentrações foi

maior quando comparado ao controle negativo ($P < 0,05$). O grupo controle positivo teve menor porcentagem de viabilidade celular em comparação aos demais grupos ($P < 0,05$).

Figura 2 - Ensaios de viabilidade celular



Viabilidade das células da polpa dental humana após exposição à *CsinCPI-2* por 24 horas. (A) Ensaio de alamar blue e (B) MTT. CN, grupo controle negativo; CP, grupo controle positivo (20% de dimetilsulfóxido – DMSO).

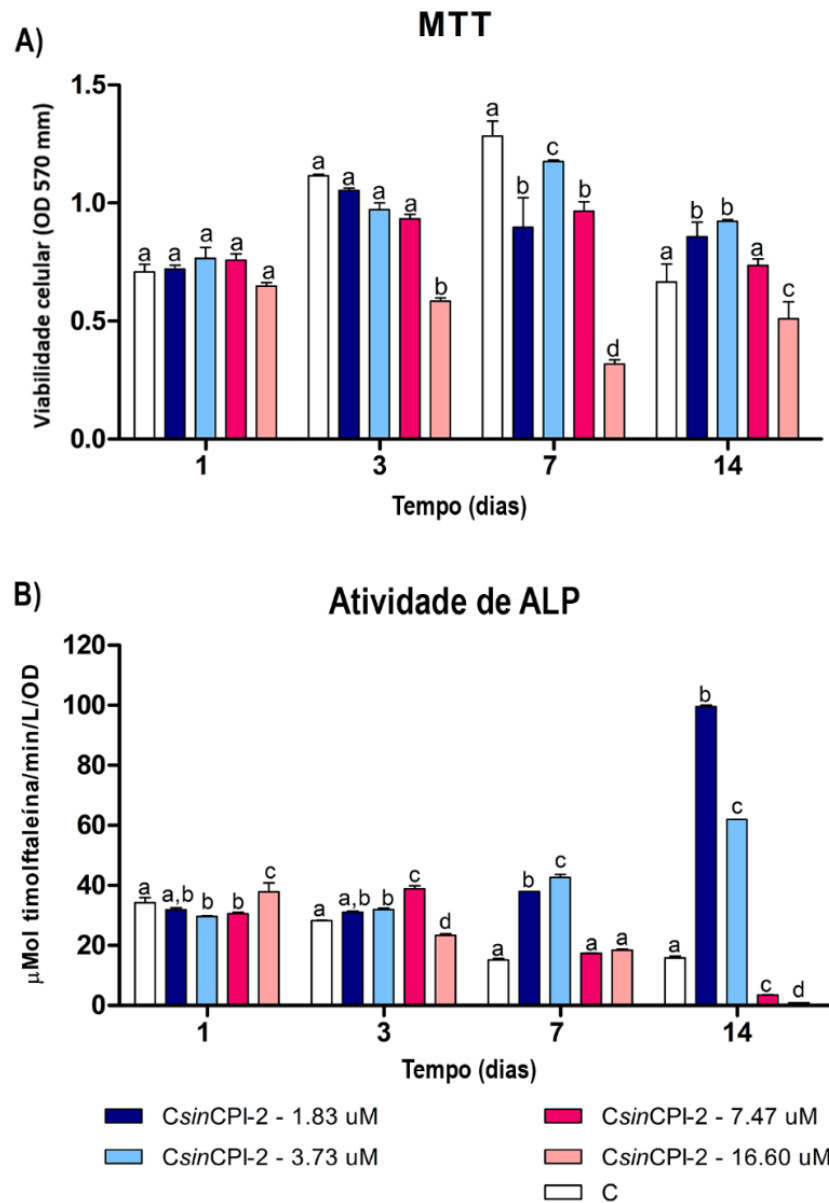
Fonte: Elaboração própria

4.3 Atividade de ALP

No primeiro dia de exposição das hDPCs à *CsinCPI-2*, não houve efeito citotóxico em todas as concentrações estudadas quando comparado ao controle ($P > 0,05$). No terceiro e sétimo dia, a viabilidade das hDPCs expostas à *CsinCPI-2* foi similar ($P > 0,05$) ou menor do que o controle ($P < 0,05$). Em 14 dias, as hDPCs expostas à *CsinCPI-2* nas menores concentrações (1,83 e 3,73 μM) apresentaram maior viabilidade do que o controle ($P < 0,05$) como mostrado no ensaio de MTT (Figura 3A). A atividade de ALP foi inversamente

proporcional à concentração de *CsinCPI-2*, ou seja, nas menores concentrações houve maior atividade de ALP. A maior atividade de ALP ($P < 0,05$) foi observada em 7 e 14 dias de tratamento com a *CsinCPI-2* a 1,83 e 3,73 μM (Figura 3B).

Figura 3 - Ensaio de atividade de fosfatase alcalina (ALP)



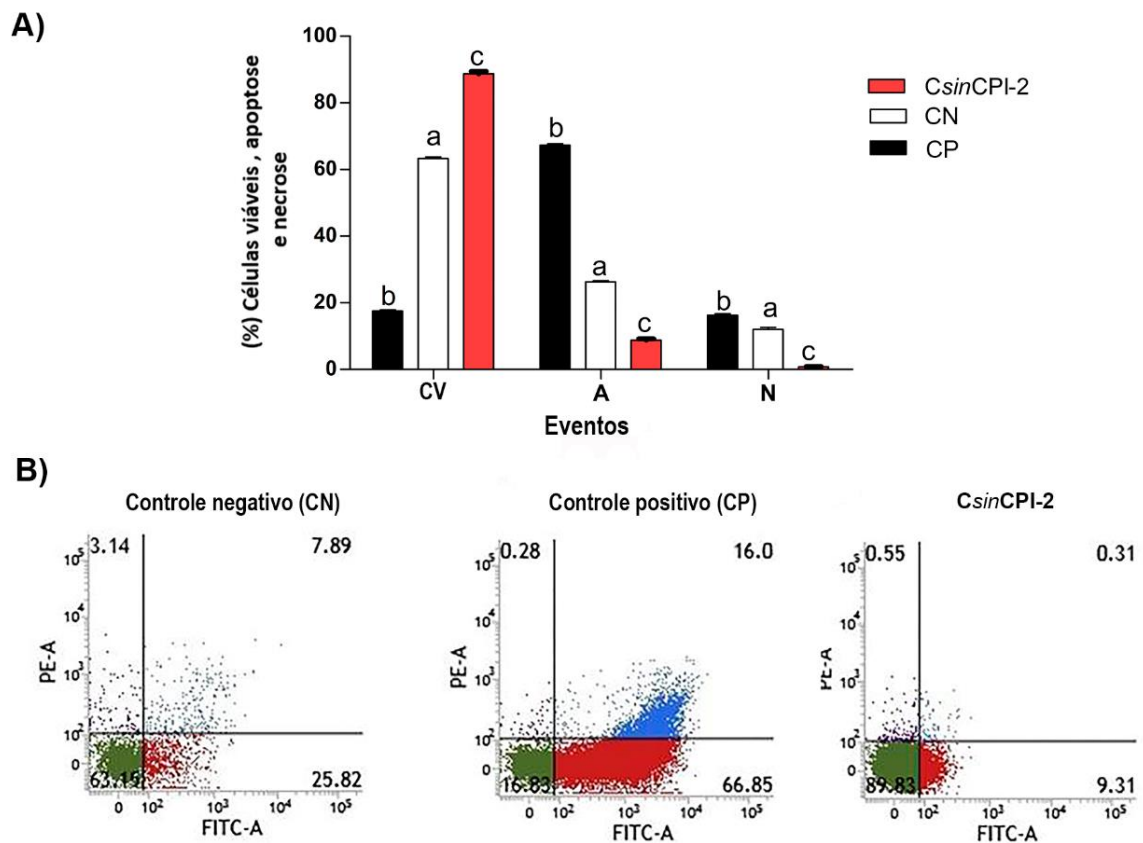
Ensaio de MTT (A) e atividade de ALP (B) realizados após a exposição das células da polpa dental humana à *CsinCPI-2* em diferentes concentrações e ao meio de cultura α -MEM não osteogênico (C- controle negativo) por 1, 3, 7 e 14 dias. Barras com diferentes letras representam diferenças significativas entre os grupos em cada período.

Fonte: Elaboração própria

4.4 Apoptose

A exposição das células à *CsinCPI-2* (3,73 μ M) por 24 horas não induziu apoptose, havendo menor porcentagem de células apoptóticas do que o controle negativo ($P < 0,05$). A população de células viáveis foi maior no grupo da *CsinCPI-2* ($P < 0,05$) quando comparado ao controle negativo (Figure 4).

Figura 4 - Ensaio de citometria de fluxo para avaliação de apoptose celular



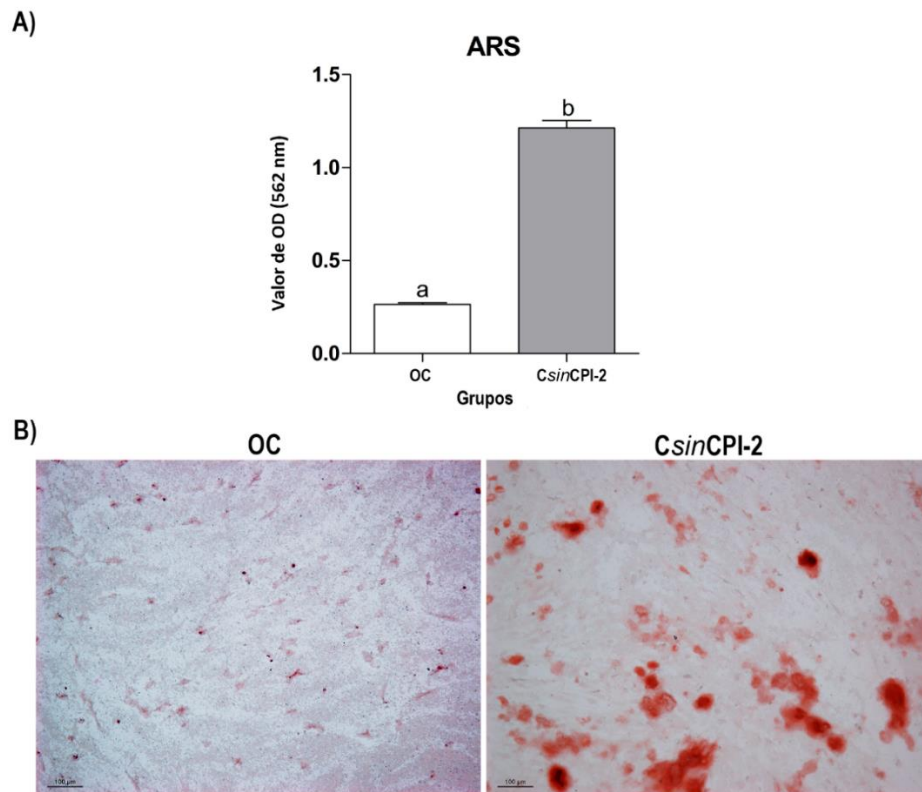
Comparação da viabilidade, apoptose e necrose por citometria de fluxo em células da polpa dental humana após exposição à *CsinCPI-2* (3,73 μ M), meio de cultura α -MEM não osteogênico (Controle negativo – CN) e peróxido de hidrogênio na concentração de 1 mM (controle positivo - CP) por 24 horas (A). Barras com diferentes letras representam diferenças significativas entre os grupos. *Dot plots* representativos dos ensaios de citometria de fluxo derivados dos dados obtidos por marcação por meio de incorporação de FITC-AnV e PE em células dos grupos controles e *CsinCPI-2* (B). A população de células viáveis (CV) (anexina-/PI -), apoptose (A) (anexina+/PI-), necrose (N) (anexina+/PI+) / (anexina-/PI+) foram representadas nos quadrantes inferior esquerdo, inferior direito, superior direito e superior esquerdo, respectivamente.

Fonte: Elaboração própria

4.5 Coloração Vermelho de Alizarina (ARS)

Em 14 dias de exposição, a *CsinCPI-2* (3,73 μ M) mostrou efeito estimulatório significativo na formação de nódulos mineralizados ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (controle 5).

Figura 5 - Ensaio de coloração vermelho de alizarina (ARS)



(A) Comparação da produção de nódulos mineralizados. (B) Imagens dos grupos controle osteogênico (OC) e *CsinCPI-2* (3,73 μ M) mostrando deposição de nódulos mineralizados (em vermelho) após 14 dias de exposição à *CsinCPI-2*. Barras com diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Barra= 100 μ m.

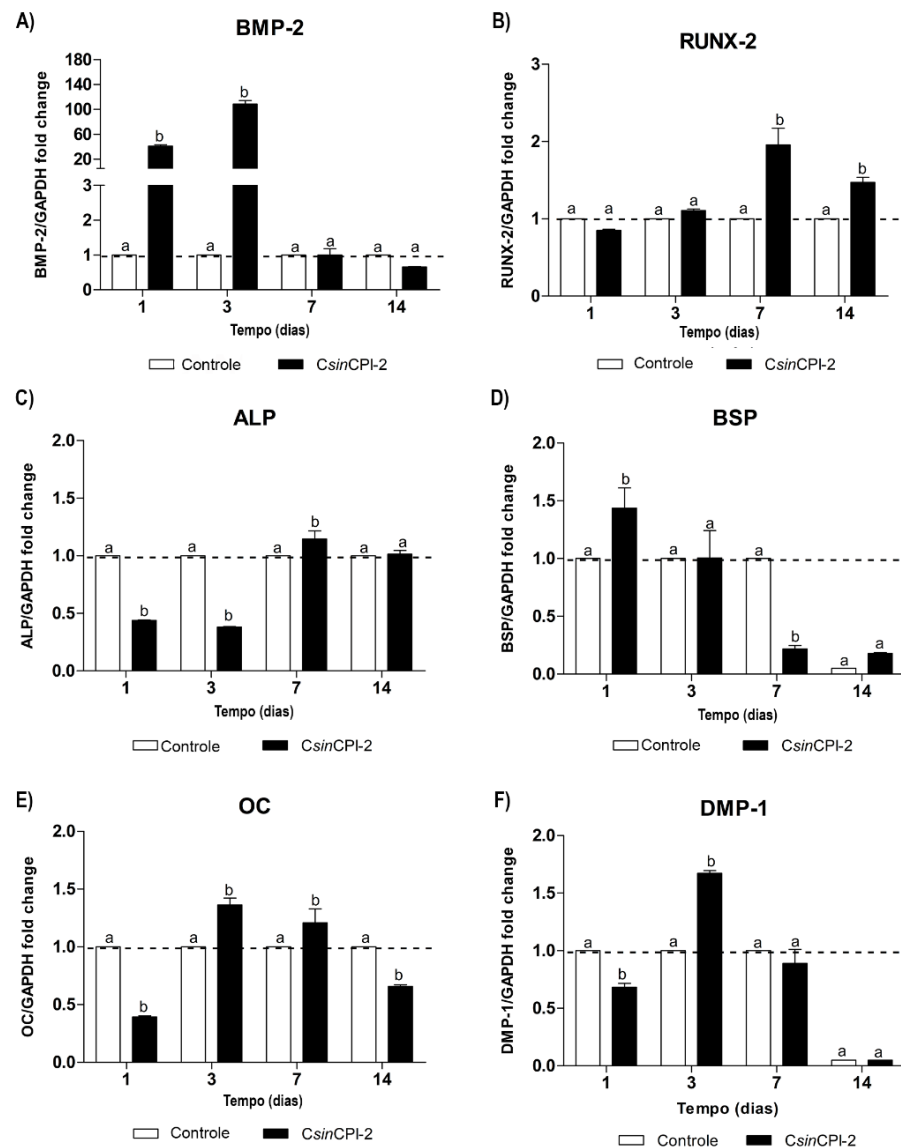
Fonte: Elaboração própria

4.6 Análise da Expressão Gênica de Marcadores Osteogênicos por qPCR

Em 1 e 3 dias, as hDPCs expostas à *CsinCPI-2* (3,73 μ M) apresentaram uma superexpressão de BMP-2 com *fold* de 40,0 e 108,0, respectivamente em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Aos 7 e 14 dias, as hDPCs expostas à *CsinCPI-2* tiveram maior expressão de RUNX2 com *fold* de 1,9 e 1,4, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). A expressão de ALP apresentou aumento com *fold* de aproximadamente 1,15 em 7 dias

($P < 0,05$) e OC estava aumentada com *fold* de 1,36 em 3 dias e 1,21 em 7 dias ($P < 0,05$). A expressão de BSP foi maior (aproximadamente um aumento com *fold* de 1,43) em 1 dia de exposição a *CsinCPI-2* ($P < 0,05$). Houve maior expressão de DMP-1 com *fold* de aproximadamente 1,6 em 3 dias de exposição das hDPCs à *CsinCPI-2* ($P < 0,05$), em relação ao controle, como mostrado na figura 6.

Figura 6 - Análise da expressão gênica por qPCR



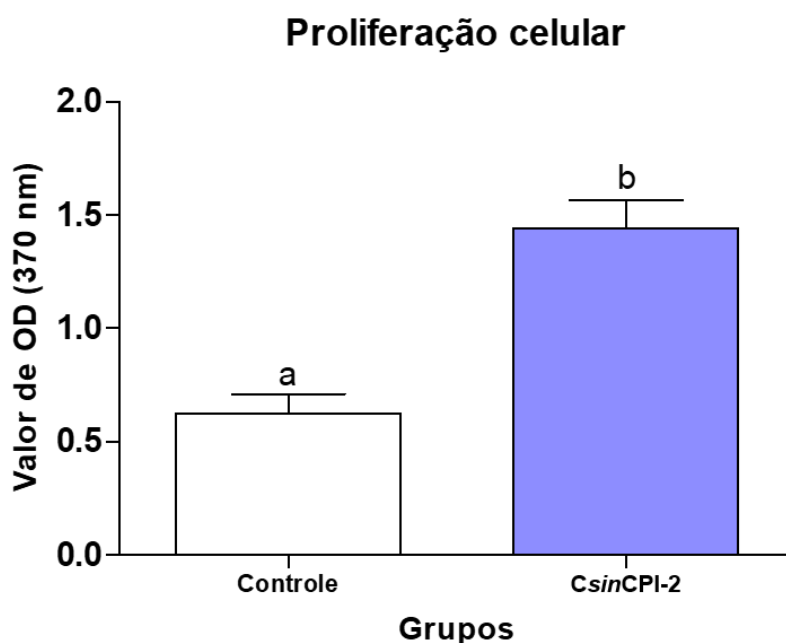
Efeito pró-osteogênico da *CsinCPI-2* em células da polpa dental humana (hDPCs) avaliado por qPCR. Níveis de expressão de mRNA dos genes alvo em hDPCs expostas à *CsinCPI-2* (3,73 µM) e ao controle (meio α -MEM) por 1, 3, 7 e 14 dias. Barras com letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada período experimental. BMP-2, proteína morfogenética óssea 2; OC, osteocalcina; ALP, fosfatase alcalina; BSP, sialoproteína óssea; RUNX2, genes do fator de transcrição 2 e DMP-1, proteína da matriz da dentina.

Fonte: Elaboração própria

4.7 Ensaio de Proliferação Celular

Como observado na figura 7, as células expostas à *CsinCPI-2* por 24 horas apresentaram maior incorporação de BrDU quando comparado com as células do grupo controle ($P < 0,05$).

Figura 7 – Proliferação celular pelo ensaio de incorporação de BrDU



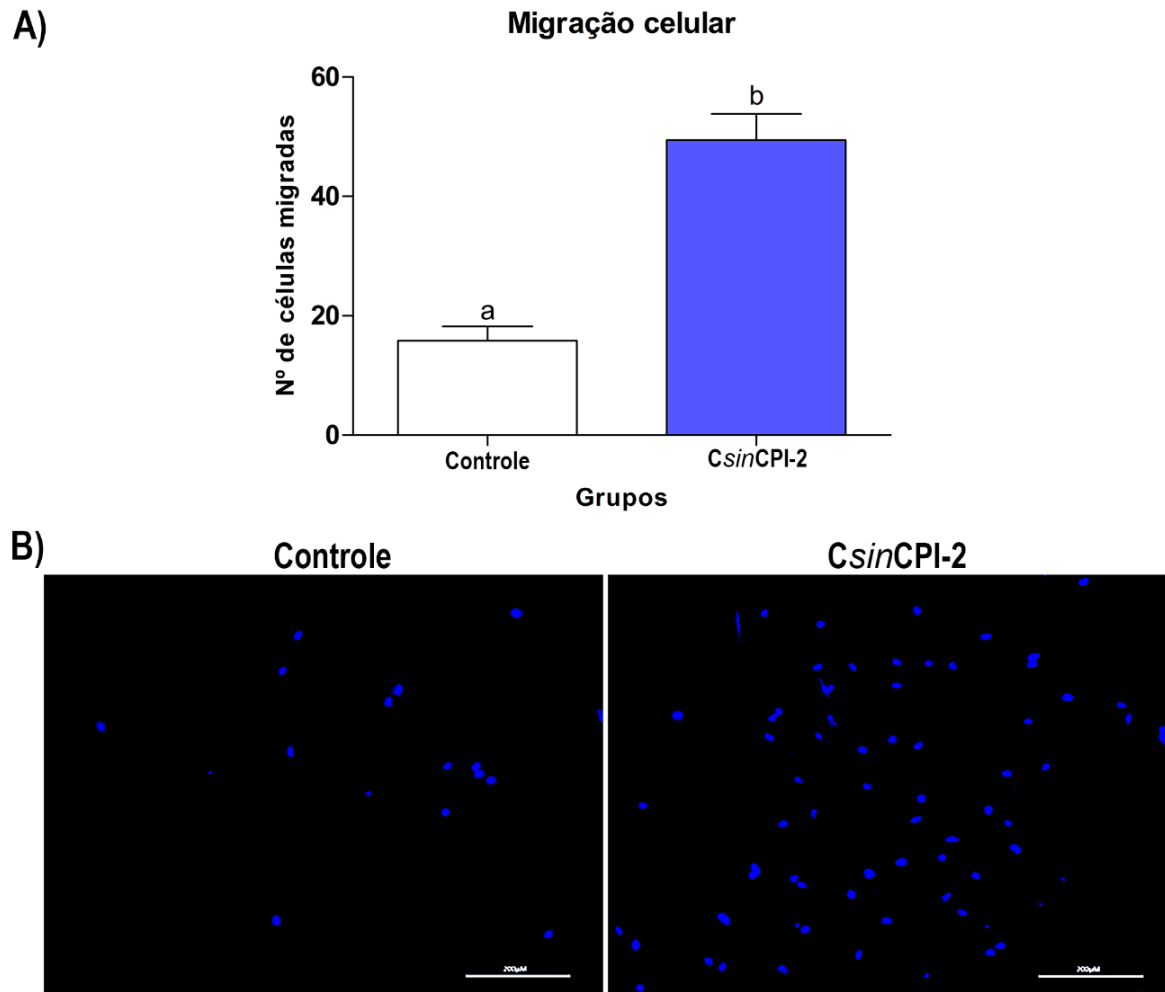
As células da polpa dental humana (hDPCs) expostas à *CsinCPI-2* 2 (3,73 μM) por 24 horas e as células não expostas (grupo controle) foram incubadas com BrDU por 8 horas. A absorbância, mensurada em espectrofotômetro com filtro de 370 nmol/L, é diretamente proporcional à quantidade de BrDU incorporada no DNA celular. Barras com diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaboração própria

4.8 Ensaio de Migração Celular por *Transwell*

Após 24 horas de exposição, a *CsinCPI-2* mostrou efeito estimulatório na migração das células; as hDPCs tratadas com *CsinCPI-2* apresentaram maior migração para a superfície inferior da membrana da transwell quando comparado com as células não tratadas ($P < 0,05$), como mostrado na figura 8.

Figura 8 - Ensaio de migração celular por *transwell*



As células da polpa dental humana (hDPCs) foram tratadas com a CsinCPI-2 2 (3,73 µM) por 24 horas. (A) Comparação da migração celular. (B) Imagens dos núcleos das hDPCs corados com *Hoestch* que migraram através da membrana da *transwell* (fluorescência azul dos núcleos). Barras com diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Barra = 200µm

Fonte: Elaboração própria

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citocompatibilidade e o efeito da *CsinCPI-2* na migração, proliferação e no desenvolvimento de fenótipo osteogênico em hDPCs. A população de hDPCs utilizada teve alta expressão de células tronco mesenquimais (CD146, CD105, CD73 e CD90) e baixa expressão de CD45 (marcador de células hematopoiéticas) e CD34 (marcador de células hematopoiéticas e endoteliais), assim como mostrado na literatura em culturas primárias de hDPCS^{57,58}.

As hDPCS expostas à *CsinCPI-2* nas diferentes concentrações por 24 horas apresentaram maior porcentagem de viabilidade que o controle. As menores concentrações de *CsinCPI-2* (1,83 μ M e 3,73 μ M) não mostraram citotoxicidade em 14 dias de exposição e induziram maior atividade de ALP em 7 e 14 dias. Por esse motivo, escolhemos a concentração de 3,73 μ M para os ensaios de apoptose, qPCR e ARS.

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é uma forma ativa de morte celular, caracterizada pela contração da membrana celular e condensação da cromatina, seguida pela fragmentação nuclear, envolvendo a ativação das caspases específicas⁵⁹. As células apoptóticas e seus fragmentos são rapidamente removidos, sem induzir reação inflamatória⁶⁰ e causando poucos danos aos tecidos circundantes⁶¹. No entanto, o descontrole da morte por apoptose pode originar doenças neurodegenerativas⁶², danos isquêmicos, distúrbios autoimunes e muitos tipos de câncer⁶³. No presente estudo, as hDPCs expostas a *CsinCPI-2* não tiveram apoptose e apresentaram maior porcentagem de células viáveis que o controle, sugerindo que ela pode induzir proliferação celular.

A reparação tecidual, essencial para restabelecer a integridade e função do tecido⁶⁴, envolve vários processos, dentre eles a proliferação e a migração de células tronco mesenquimais para o local da lesão⁴⁵. Para avaliar o efeito da *CsinCPI-2* na proliferação e migração das hDPCs foram utilizados os ensaios de BrdU e de *transwell*, respectivamente. O ensaio colorimétrico de BrdU quantifica a proliferação celular por meio da medição da incorporação de BrDU durante a síntese de DNA em células que estão se multiplicando^{65,66}. Há basicamente dois tipos de ensaios de migração celular, o ensaio de *transwell* e de *scratch assay*. O ensaio de *scratch assay* não foi utilizado, porque os resultados de migração obtidos com ele podem ser influenciados pela proliferação celular e também pela espessura variada da “ferida” criada pelo operador⁶⁷. O princípio do ensaio de *transwell* é baseado em duas câmaras separadas por meio de uma membrana porosa na qual as células transmigram. O tamanho das células a serem analisadas determina o tamanho necessário do poro das membranas. É essencial escolher o diâmetro do poro que permita uma transmigração ativa, ou seja, o diâmetro do poro deve ser

menor do que o diâmetro da célula para evitar quedas inespecíficas das células. As membranas estão disponíveis com poros de diâmetros entre 3 e 12mm⁶⁷. Para realização do ensaio de migração foi escolhida *transwell* com poro de tamanho de 8µm, com base em estudos que realizaram estudos semelhantes ao nosso utilizando hDPCs⁶⁸⁻⁷⁰. As células expostas à *CsinCPI-2* apresentaram maior proliferação e migração do que as não tratadas. Os resultados de proliferação estão de acordo os resultados dos ensaios de MTT e de citometria de fluxo e com estudo recente que mostrou um aumento na proliferação celular de células osteoblásticas de camundongo, MC3T3-E1, tratadas com a cistatina C purificada⁷¹. A cistatina C é um inibidor natural de cisteína protease que suprime a diferenciação e a função de reabsorção dos osteoclastos²⁷.

A BMP-2, membro da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β), desempenha um papel decisivo durante a formação óssea, regeneração e processos de reparo ósseo^{72,73}. *CsinCPI-2* estimulou uma maior expressão de mRNA do marcador osteogênico BMP-2 em 1 e 3 dias de exposição. De acordo com a literatura, os inibidores de cisteína proteases podem estimular a expressão de BMP-2²⁷, e suprimir a degradação dos fatores de crescimento como BMP-2 na matriz orgânica e consequentemente, aumentar a formação óssea²⁸.

O marcador osteogênico RUNX2 coordena múltiplas vias de sinalização relacionadas a diferenciação dos osteoblastos⁷⁴. Houve um aumento na expressão gênica de RUNX2 em 7 e 14 dias após a exposição das células hDPCs a *CsinCPI-2* quando comparado ao grupo controle. Danjo et al.²⁷ mostram que células da medula e da calvária de ratos tratadas com a cistatina C tiveram expressão aumentada do gene RUNX2 em 7, 14 e 21 dias, concordado com os resultados obtidos no presente estudo.

O gene OC, que regula a fase mineral da osteogênese, é um fator de estágio tardio da diferenciação celular^{39,75}. A BSP é secretada principalmente por osteoblastos, e a sua expressão é crucial para a deposição e mineralização da matriz^{76,77}. O aumento da expressão de BSP sugere a diferenciação de várias células em osteoblastos⁷⁸. A ALP tem sido implicada em vários papéis-chave na mineralização óssea⁷⁹. No presente estudo, houve um aumento na expressão dos mRNA dos marcadores osteogênicos OC, BSP e ALP em hDPCs tratadas com *CsinCPI-2*.

A DMP-1 é uma proteína não-colagênica da dentina expressa por células da polpa dental e odontoblastos, que exerce papel importante⁸⁰, na mineralização e maturação da pré-dentina durante a dentinogênese⁸¹. Além disso, o gene DMP-1 é expresso na fase inicial de diferenciação de osteoblastos e também facilita a expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteo/odontogênicos⁸². De acordo com Suzuki et al.⁸², a DMP-1 age diretamente

a mineralização óssea, pois camundongos deficientes para este gene tiveram mineralização óssea deficiente. Os resultados do presente estudo mostraram que as hDPCs tiveram aumento significativo de expressão DMP-1 em 3 dias de exposição à *CsinCPI-2*. Um estudo em células tronco da polpa de dente de furões mostrou maior expressão gênica de DMP-1 em 4 dias de avaliação em meio osteogênico⁸³. Os nossos resultados mostraram que sem o meio indutor (osteogênico) a *CsinCPI-2* foi capaz de estimular a expressão de DMP-1, ou seja, apresentou potencial de induzir diferenciação osteo/odontogênica. No entanto, não podemos afirmar que a *CsinCPI-2* induz diferenciação odontoblástica pois, para isto, é necessário avaliar outros marcadores de odontoblasto.

A ALP é uma das principais enzimas expressas durante a maturação inicial dos osteoblastos e desempenha um papel importante na deposição de minerais⁸⁴. O aumento da atividade de ALP indica uma maior expressão de fenótipo osteogênico⁷⁹. O ensaio de coloração de vermelho de alizarina permite quantificar depósitos de cálcio em culturas de células⁸⁵. A *CsinCPI-2* estimulou a atividade de ALP e a deposição de nódulos mineralizados e, portanto, induziu a diferenciação das hDPCs em fenótipo osteogênico. Os resultados do presente estudo corroboram com o estudo no qual as células da medula óssea e da calvária de ratos tratadas com cistatina C apresentaram aumento da atividade de ALP, a formação de nódulos mineralizados e a expressão de mRNA dos genes BMP-2, RUNX2 e OC²⁷.

Finalmente, considerando os efeitos na indução da proliferação, migração e no desenvolvimento do fenótipo osteogênico, mostrados no presente estudo, somado à inibição das catepsinas K e B e potencial anti-inflamatório⁴³, com consequente controle da reabsorção óssea, a *CsinCPI-2* pode ser uma molécula promissora para aplicações biotecnológicas. Assim, ela poderia ser incorporada em *scaffolds* ou medicação intracanal usados em técnicas de regeneração endodôntica, para promover a regeneração/reparação pulpar e periapical. Além disso, outras aplicações potenciais ocorrem em níveis sistêmicos, por exemplo, no caso de patologias ósseas que afetam todo o esqueleto. Apesar dos resultados promissores, estudos são necessários para avaliar as vias de sinalização envolvidas na diferenciação em fenótipo osteogênico induzido pela fitocistatina *CsinCPI-2* em hDPCS, bem como determinar se os seus efeitos benéficos in vitro correspondem a um aumento e / ou aceleração do reparo tecidual in vivo. Além disso, é necessário avaliar se a *CsinCPI-2* induz expressão de marcadores odontogênicos em hDPCs.

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, Barrett 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, Hulténby 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.

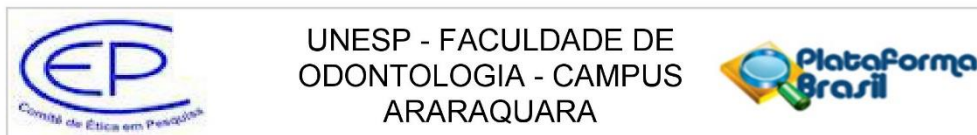
58-Bakopoulou A, Georgopoulou A, Grivas I, Bekiari C, Prymak O, Loza K et al. Dental pulp stem cells in chitosan/gelatin scaffolds for enhanced orofacial bone regeneration. *Dent Mater*. 2019; 35(2): 310-327.

- 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.

ANEXO A - Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia - Campus Araraquara aprovando a realização da pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da fitocistatina citrus CPI-2 sobre a proliferação, migração e diferenciação de células da papila apical e polpa dental humanas

Pesquisador: Gisele Faria

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 90278518.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.950.595

Apresentação do Projeto:

Segundo os autores, o objetivo do projeto é “estudar o efeito da fitocistatina Citrus CPI-2 sobre a proliferação, migração, diferenciação e mineralização de células de cultura primária da papila apical e da polpa dental humanas. Se for confirmado que a Citrus CPI-2 estimula a diferenciação osteo/odontogênica das células da polpa e da papila apical, ensaios adicionais serão realizados, buscando conhecer o envolvimento da via BMP/SMAD neste processo. Para a cultura celular, serão coletados de 12 pacientes a papila apical e/ou polpa dental de terceiros molares humanos, extraídos por razões ortodônticas, que não apresentem lesão de cárie ou doença periodontal, de pacientes jovens e saudáveis com idade entre 16-25 anos, que comparecerem na clínica de cirurgia da FOArUNESP. Os tecidos da papila e da polpa serão fragmentados e transferidos para uma solução de 3 mg/mL de collagenase tipo I e 4 mg/mL de dispase durante 30 minutos a 37°C e em seguida as células serão cultivadas em -MEM (Sigma-Aldrich). Antes da realização dos ensaios, as células serão submetidas ao procedimento de detecção da expressão de marcadores de superfície de células tronco por meio de citometria de fluxo. Os ensaios serão realizados em triplicata utilizando células de 3 doadores da 3ª a 6ª passagem. No entanto, fizemos a previsão de coletar as células de dentes de 12 pacientes, devido a perdas que podem ocorrer devido à contaminação da cultura celular ou à não proliferação das células em cultura, para que ao final tenhamos as células de pelo menos 3 doadores. Para a realização dos ensaios, as células serão cultivadas em placas de 96, 24 com ou sem o uso de transwell, 12 e 6 poços, placas de 10mm e

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

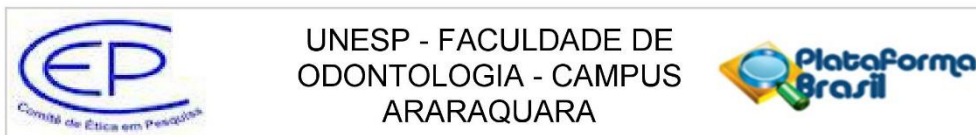
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.950.595

LabTek, contendo -MEM com SFB 10% e serão mantidos na estufa por 24 horas para aderirem nas placas. Então as células serão tratadas com a Citrus CPI- 2 e posteriormente serão avaliados viabilidade, metabolismo, proliferação e migração celular, apoptose, atividade da fosfatase alcalina, precipitados inorgânicos, expressão gênica e a expressão proteica de marcadores de diferenciação e de mineralização e análise de translocação nuclear de SMAD1/5/8. A análise estatística dos resultados será efetuada empregando nível de significância de 5% e os testes serão escolhidos de acordo com a distribuição e homocedasticidade dos dados.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral será investigar o efeito odonto/osteopromotor da fitocistatina Citrus CPI-2 em células de cultura primária da polpa dental e da papila apical humanas. Especificamente, serão avaliados seu efeito na proliferação, migração, diferenciação e mineralização in vitro. Se for confirmado que a Citrus CPI-2 estimula a diferenciação osteo/odontogênica das células da polpa e da papila apical, ensaios adicionais serão realizados, buscando conhecer o envolvimento da via BMP/SMAD neste processo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

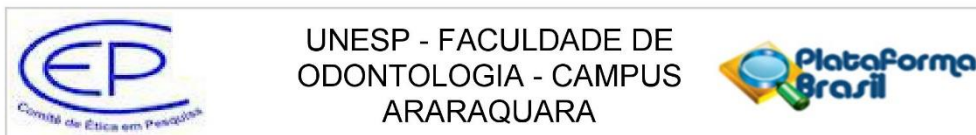
Riscos: A coleta das células da papila apical e polpa dental não oferece riscos para o paciente uma vez que esta coleta é realizada após extração dentária. Além disso, serão asseguradas as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP para realizar essa pesquisa. Em relação à extração dentária propriamente dita, ela será realizada por residentes da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, que são treinados para realizar o procedimento. Caso os pacientes apresentem complicações pós-operatórias como edema, dor, infecção ou alveolite, eles serão atendidos pelos residentes, que tomarão as providências para solucionar os problemas. Além disso, serão asseguradas as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP para realizar essa pesquisa.

Benefícios: O benefício principal é que se a CitrusCPI-2 induzir a diferenciação osteo/odontogênica de células da polpa dental e da papila apical, ela poderá se constituir em uma molécula promissora para aplicações biotecnológicas, sobretudo para proteção pulpar direta e em técnicas de regeneração endodôntica ou, ainda, como componente de medição intracanal para favorecer o reparo/regeneração pulpar e periapical.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores possuem recurso financeiro aprovado na FAPESP e pretendem avaliar o efeito

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.950.595

odonto/osteopromotor da fitocistatina Citrus CPI-2 em células de cultura primária da polpa dental e da papila apical humanas e se a Citrus CPI-2 induzir a diferenciação osteo/odontogênica destas células, ela poderá se constituir em uma molécula promissora para ser empregada na proteção pulpar direta e em técnicas de regeneração endodôntica ou, ainda, como componente de medição intracanal para favorecer o reparo/regeneração pulpar e periapical.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1132356.pdf	04/10/2018 14:29:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	04/10/2018 14:27:28	Gisele Faria	Aceito
Cronograma	Cronograma_alterado.pdf	04/10/2018 14:23:11	Gisele Faria	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	04/10/2018 14:22:45	Gisele Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_P2.pdf	04/10/2018 14:19:25	Gisele Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pais_ou_responsavel_P2.pdf	04/10/2018 14:19:04	Gisele Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maior.pdf	04/10/2018 14:18:46	Gisele Faria	Aceito
Outros	AutorizacaoLab.pdf	24/05/2018	Gisele Faria	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

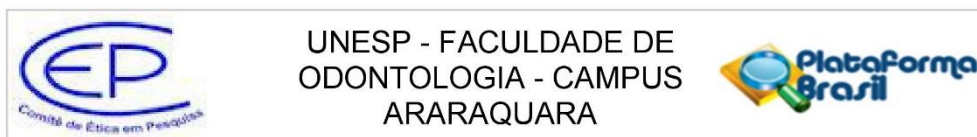
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.950.595

Outros	AutorizacaoLab.pdf	14:03:59	Gisele Faria	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	22/05/2018 15:35:51	Gisele Faria	Aceito
Outros	Autorizacao_coleta_CTBMF.pdf	21/05/2018 17:02:54	Gisele Faria	Aceito
Outros	declaracao.pdf	21/05/2018 16:58:38	Gisele Faria	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	21/05/2018 16:49:45	Gisele Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 09 de Outubro de 2018

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até dia 29/11/2021*

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 29 de novembro de 2019

KENNIA SCAPIN VIOLA

* O prazo é de até dois anos após a defesa