



**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 abdições, 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. Parkhurst\*

---

\* 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

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>3 PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 ARTIGO .....</b>	<b>19</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>51</b>

## 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<sup>1</sup>. Várias doenças envolvem desequilíbrio no processo de remodelação óssea com o predomínio de reabsorção, como a osteoporose, artrite, doença periodontal e periodontite apical<sup>2-5</sup>. 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<sup>6,7</sup>.

Cisteíno proteases são expressas em todos os organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, plantas e animais<sup>8,9</sup>, e estão divididas em 82 famílias e 14 clãs<sup>10</sup>. 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<sup>2,11</sup>, 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<sup>12,13</sup>. No sequenciamento do genoma humano (2003) foram descritas 11 cisteína catepsinas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W)<sup>14</sup>.

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<sup>2,12,13</sup>.

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

Na Odontologia, a catepsina K está envolvida na patogênese de doenças como cárie, doença periodontal e periodontite apical<sup>4,5,18,19</sup>. 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<sup>3</sup>. 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<sup>4,20</sup>.

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<sup>21</sup>. 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<sup>2</sup>. 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<sup>22</sup>, por exemplo, em casos de osteoporose<sup>23</sup>. 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<sup>13</sup>. Por outro lado, alternativas homólogas são necessárias e devem ser pesquisadas<sup>24</sup>.

Além da inibição das cisteína catepsinas, alguns estudos têm mostrado que as cistatinas podem apresentar efeito pró-osteogênico. Danjo et al.<sup>25</sup> 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<sup>26</sup>. Mais recentemente, Yasueda et al.<sup>27</sup> 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<sup>28</sup>. Esse grupo é subdividido em 4 famílias, sendo 3 de origem animal e uma derivada de plantas, as chamadas fitocistatinas<sup>29</sup>. As cistatinas das famílias 1, 2 e 3 estão presentes no corpo humano intracelularmente ou distribuídas nos tecidos, fluidos e plasma sanguíneo<sup>30-32</sup>. 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<sup>33-38</sup>. Elas são proteínas pequenas, com massa molecular de aproximadamente 12-16kDa<sup>39</sup>, e têm capacidade de inibir enzimas da classe C1A ou papaínas<sup>40</sup>. 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<sup>9,24,32,37</sup>.

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<sup>32</sup>. 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*<sup>33</sup>, e se mostrou capaz de inibir as catepsinas humanas B, K, L e V<sup>8</sup>. Atualmente existem seis cistatinas recombinantes derivadas da cana-de-açúcar: CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4, CaneCPI-5 e Cane-CPI-6<sup>9,24,38,41,42</sup>. CaneCPI-2 e CaneCPI-3 apresentaram atividade inibitória contra a papaína<sup>9</sup>, sendo que a CaneCPI-3 também foi capaz de inibir a legumaína<sup>43</sup>. A CaneCPI-4 mostrou inibição das catepsinas humanas B e L, além de reduzir significativamente 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<sup>41,44</sup>, o que demonstra o potencial das fitocistatinas para aplicações terapêuticas na área médica<sup>24</sup>.

Mais recentemente, foi mostrado o potencial para uso odontológico de fitocistatinas recombinantes. Santiago et al.<sup>24</sup> 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<sup>45</sup>. 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<sup>46</sup>. 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<sup>47</sup>. No entanto, em outro estudo, embora ela tenha reduzido significativamente a viabilidade do biofilme microcosmo de saliva humana/McBain, isto não refletiu no seu potencial anticárie<sup>48</sup>. 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<sup>49</sup>.

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<sup>50</sup>.

Além da CaneCPI-5, o nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a cistatina recombinante derivada da *Citrus sinensis* ou laranja doce, denominada *Csin*-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<sup>36</sup>. Em outro estudo mais

recente, a *Csin*-CPI2, empregada sistemicamente, preveniu a perda óssea induzida pela doença periodontal em camundongos, por meio da redução da inflamação e da osteoclastogênese<sup>51</sup>. Além disso, a *Csin*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<sup>36</sup>. Para compreender melhor esse efeito pró-osteogênico, nosso grupo de pesquisa expôs pré-osteoblastos MC3T3-E1 à *Csin*CPI-2, e avaliou fenômenos de adesão, proliferação e diferenciação celular. Os resultados mostraram que nas primeiras horas de tratamento, a proteína *Csin*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  $\beta$ -catenina e aumento da expressão de RUNX2 no grupo que recebeu o tratamento com *Csin*CPI-2<sup>52</sup>.

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<sup>53-55</sup>. 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<sup>56,57</sup>.

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram potencial efeito pró-osteogênico da *Cane*CPI-5; pré-osteoblastos MC3T3-E1 tratados com a *Cane*CPI-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<sup>58</sup>. Considerando o potencial das fitocistatinas de induzir fenótipo osteogênico<sup>36</sup>, bem como os nossos resultados preliminares mostrando efeito altamente positivo da *Cane*CPI-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).

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citocompatibilidade e o efeito da CaneCPI-5 sobre a proliferação, migração, diferenciação osteogênica de hDPSCs.

Especificamente, 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).

### 3 PUBLICAÇÃO

Este item está escrito no formato de artigo.

#### 3.1 Artigo\*

##### **Efeito pró-osteogênico da cistatina recombinante de cana-de-açúcar CaneCPI-5 em células pulpare humanas**

#### **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.

---

\* Artigo em fase de correção para ser enviado para publicação.

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

## INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo dinâmico e equilibrado que envolve a reabsorção de componentes presentes na matriz mineralizada e a deposição de novo osso pelos osteoblastos (Szulc, 2018). Algumas doenças estão relacionadas a uma quebra deste equilíbrio com consequente predomínio da reabsorção tecidual, por exemplo a osteoporose, artrite, doença periodontal e periodontite apical (Vasiljeva et al., 2007; Gao et al., 2013; Hao et al., 2015a, Hao et al., 2015b). A degradação da porção orgânica do osso, composta principalmente por colágeno tipo I, depende da atividade de proteases específicas como as metaloproteases da matriz (MMPs) e cisteíno proteases, especialmente a catepsina K, sendo esta, um alvo para o tratamento de algumas doenças que envolvem a reabsorção óssea (Vasiljeva et al., 2007, Lu et al., 2018).

Fisiologicamente, em mamíferos, as cistatinas endógenas inibem de maneira reversível as cisteíno proteases regulando a atividade das mesmas (Lu et al., 2018). Foi demonstrado que as cistatinas, principalmente as inibidoras da catepsina K, têm potencial para serem utilizadas como fármacos por serem antagonistas da atividade osteoclástica e reduzirem a perda óssea (Yu et al., 2017). Além dessa função, estudos também mostraram efeito pró-osteogênico de algumas cistatinas (Danjo et al., 2007; Yasueda et al., 2018).

As cistatinas derivadas das plantas, principalmente angiospermas como arroz, laranja e cana-de-açúcar (Soares-Costa et al., 2002; Udenigwe et al., 2016; Leguizamón et al., 2019) são chamadas fitocistatinas (Margis et al., 1998). Elas estão envolvidas na regulação das proteases endógenas nas plantas (Tremblay et al., 2019), sendo que algumas já foram produzidas de forma recombinante. Atualmente, existem seis cistatinas recombinantes derivadas da cana-de-açúcar, CaneCPI-1 a CaneCPI-6, com uma variedade de efeitos e aplicações biotecnológicas já demonstradas (Shibao et al., 2021). A CaneCPI-5, proteína alvo deste estudo, mostrou-se um potente inibidor das catepsinas humanas K, B e L (Santiago et al., 2017) e apresentou resultados favoráveis ao reparo tecidual, por meio da redução da inflamação, induzida por implante de esponja no subcutâneo de camundongos, e

favorecimento da angiogênese e fibrinogênese (Ferreira et al., 2021). Na área odontológica, a CaneCPI-5 vem sendo estudada e mostrou reduzir e prevenir a erosão do esmalte dental frente a desafios ácidos, tanto in vitro como in vivo, por interagir com a película adquirida (Carvalho et al., 2020; Pelá et al., 2021a). Ainda, reduziu a viabilidade do biofilme sobre o esmalte dental, embora não tenha apresentado potencial anticárie (Pelá et al., 2021b). Por outro lado, ela não alterou as características e viabilidade do biofilme sobre a dentina (Frazão Câmara et al., 2021).

Além da CaneCPI-5, a cistatina recombinante derivada da laranja doce, *CsinCPI-2* também tem apresentado potencial para aplicação biotecnológica. *CsinCPI2* preveniu a perda óssea induzida pela doença periodontal em camundongos, por meio da redução da inflamação e da osteoclastogênese (Leguizamon et al., 2022). Adicionalmente, ela apresentou efeito pró-osteogênico em células pulpares humanas (Leguizamón et al., 2019) e em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 (da Costa Fernandes et al., 2021).

Para ocorrer o reparo pulpar, periapical ou a regeneração endodôntica, é necessário que as células-tronco mesenquimais da papila apical e/ou da polpa dental se proliferem, migrem para o local da lesão e se diferenciem em células produtoras de tecido mineralizado. Sendo assim, é interessante que os materiais utilizados no tratamento endodôntico estimulem esses eventos (Lin et al., 2011). Considerando o potencial de determinadas fitocistatinas recombinantes de induzir fenótipo osteogênico (Leguizamón et al., 2019) o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito osteopromotor da CaneCPI-5 sobre células-tronco mesenquimais da polpa dental humana (hDPSCs).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Expressão e purificação da proteína recombinante CaneCPI-5**

A proteína alvo deste estudo foi produzida de forma recombinante como descrito anteriormente (Santiago et al., 2017) na Universidade Federal de São Carlos.

## **Cultura celular**

Após aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP – FOAr (CAAE: 36595920.7.0000.5416), o tecido pulpar de terceiros molares hígidos, extraídos de doadores jovens, foi coletado para obtenção da cultura primária de hDPSCs utilizando o método de dissociação enzimática (Gronthos et al., 2000). As células foram cultivadas em  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL) (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 10% de soro fetal bovino - SBF (Gibco/Life Technologies) em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Células da 3ª a 6ª passagem foram utilizadas nos ensaios.

## **Caracterização imunofenotípica das culturas de células da polpa dental**

A cultura de células da polpa dental humana 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) todos da BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA, EUA. As células em cultura, na 3ª passagem, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e coletadas com detergente não enzimático (Cell Dissociation Buffer – Gibco). Em seguida,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com os anticorpos mouse anti-human conjugados com o fluorocromos phycoerythrin (PE) ou fluorescein isothiocyanate (FITC) por 45 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. As células foram centrifugadas, ressuspensas em *stain buffer* (PBS + 2% *bovine serum albumin*) e analisadas em separador de células ativado por fluorescência - FACS (BD Biosciences FACS Verse 4C, Pharmingen).

## **Avaliação da viabilidade celular por ensaio de alamarBlue**

O ensaio de alamarBlue foi utilizado para avaliar a viabilidade celular. As hDPSCs foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) por 24 horas e então foram expostas a diferentes concentrações da CaneCPI-5 (0,0125  $\mu$ g/uL; 0,025  $\mu$ g/uL; 0,05  $\mu$ g/uL; 0,1  $\mu$ g/uL; 0,2  $\mu$ g/uL) ou ao meio de cultura  $\alpha$ -MEM (controle negativo) por 24 e 48 horas. Após os períodos, as células foram incubadas com meio de cultura contendo o reagente alamarBlue (10:1, (Invitrogen, Life Technologies) por 3h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 100 $\mu$ L do sobrenadante foi

passado para outra placa para leitura em leitor de fluorescência empregando comprimento de onda de 560 nm excitação e 590 nm emissão (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada comparando a fluorescência das células tratadas com cada concentração da CaneCPI-5 com o controle negativo, o qual foi considerado 100% de viabilidade celular.

### **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). Após 24h do plaqueamento ( $1,5 \times 10^4$  células/poço em placa de 96 poços) as células foram tratadas com a CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ou meio de cultura  $\alpha$ -MEM. A solução de BrdU foi adicionada em cada poço, e as células foram incubadas por 18h a 37°C totalizando os períodos de análises de 24 e 48h. Em seguida o meio de cultura foi removido, as células foram fixadas e o DNA desnaturado. O fixador foi removido e as células foram incubadas com o anticorpo para BrdU por 2h. Os poços foram lavados com o *Washing Solution* do kit e a solução de substrato foi adicionada para leitura da absorbância em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 370nm (Asys UVM 340, Cambridge, Londres). Os resultados foram representados pela porcentagem do grupo CaneCPI-5 em relação ao grupo controle.

### **Ensaio de migração celular por *transwell***

O ensaio de migração celular foi realizado para avaliar a capacidade quimiotática da CaneCPI-5. As hDPSCs ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas no compartimento superior do inserto de *transwell* (poro de 8 $\mu\text{m}$ , Corning) com  $\alpha$ -MEM 1% de SBF. O compartimento inferior foi preenchido com  $\alpha$ -MEM 1% de SBF com CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ou meio de cultura sem tratamento (controle), sendo utilizados 4 *transwell* por grupo. Após 24h de incubação, as células do compartimento superior foram removidas, e as que ultrapassaram a membrana foram fixadas e coradas com Dapi (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Life Technologies). Cinco campos de cada *transwell* foram selecionados ao acaso e as imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (EVOS FI microscope, AMC, Bothell, WA, EUA) para análise. Para quantificar as células que migraram, foi utilizado o software ImageJ.

### **Ensaio de coloração com vermelho de alizarina**

O ensaio de coloração com vermelho de alizarina foi realizado para avaliar a formação de nódulos calcificados nas hDPSCs em contato com a CaneCPI-5 como parâmetro para mensurar o seu potencial de biomineralização. As células foram plaqueadas em placa de 24 poços ( $5 \times 10^3$  células/poço) e expostas à CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) diluída em meio de cultura  $\alpha$ -MEM osteogênico, contendo ácido ascórbico (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e  $\beta$ -glicerofosfato (10mM) (Sigma Aldrich) ou ao meio osteogênico (controle). Os meios foram renovados a cada 48 horas durante 21 dias. Após este período as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C e então coradas com solução de vermelho de alizarina a 40mM (pH 4.2; Sigma-Aldrich) por 15 min sob agitação. O corante foi removido e a matriz mineralizada foi visualizada em um estereomicroscópio (SZ2-ILST, Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera (E-330, Olympus). Em seguida, a solução de cloreto de cetilpiridínio a 10% (Sigma/Aldrich) foi usada para solubilizar a matriz. Alíquotas de 100 $\mu\text{L}$  foram transferidas para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro com filtro de 562 nm de comprimento de onda (Asys-UVM 340, Biochrom - Mikro Win 2000). Os resultados foram representados pela porcentagem do grupo CaneCPI-5 em relação ao controle osteogênico considerado como 100%.

### **Atividade da fosfatase alcalina tecidual inespecífica (TNAP)**

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^4$  células/poço) e expostas à CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) diluída em meio osteogênico, ao meio osteogênico (controle positivo) ou ao meio  $\alpha$ -MEM (controle negativo), pelo período de 7 dias, sendo os meios renovados a cada 48 horas. Após os 7 dias, as células foram lavadas com tampão estoque (Tris 50mM e  $\text{MgCl}_2$  2mM, pH 7,5) e, em seguida, foi adicionado o tampão de choque osmótico (Tris-HCl 50mM,  $\text{MgSO}_4$  10mM e NaCl 0,8M, pH 7,5) para coleta e lise das células. A suspensão de células foi homogeneizada para ruptura celular suave e ultracentrifugadas a 100.000xg por 1 hora a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso e homogeneizado no tampão estoque. Alíquotas dessa suspensão contendo a fosfatase alcalina ligada à membrana foram adicionadas ao meio reacional (solução aquosa contendo 70mM de 2-amino-2-metil-propan-1-ol (AMPOL) pH 10, 10mM de p-nitrofenil-fosfato (pNPP) e 2mM de  $\text{MgCl}_2$ ) em intervalos de tempos apropriados e as reações foram interrompidas nos mesmos intervalos de tempo com NaOH 1M. A atividade catalítica da TNAP foi monitorada por mudanças na intensidade

da banda de absorção UV-Vis em 410 nm, correspondendo à formação de p-nitrofenolato (pNP-), um produto da hidrólise do pNPP catalisado por enzimas. A concentração de pNP- (absortividade molar  $17600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) foi calculada usando a lei de Lambert Beer. Os espectros foram obtidos através de um espectrofotômetro Hewlett Packard modelo 8453 UV-Vis. Os dados foram normalizados pela concentração total de proteína determinada pelo método de Hartree (Hartree, 1972), e foram expressos em porcentagem, sendo o controle osteogênico considerado 100%.

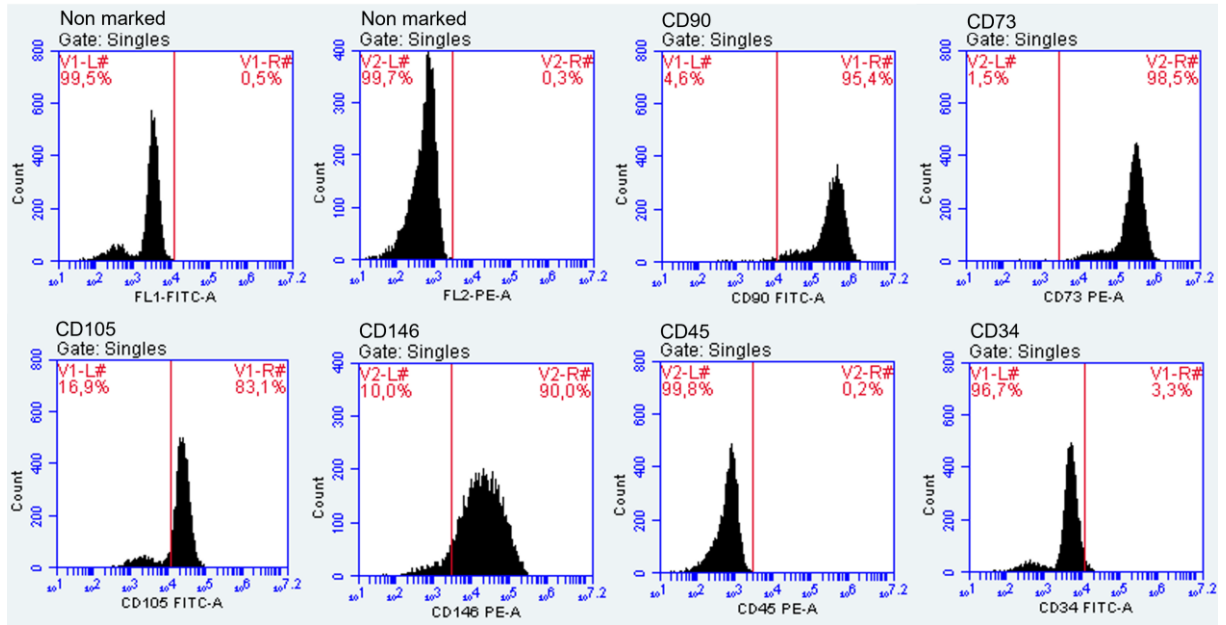
### **Análise estatística**

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico GraphPadPrism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5%. Os dados foram avaliados por ANOVA de uma ou duas vias, seguido de pós-teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, ou Mann Whitney.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização imunofenotípica das culturas de hDPSCs**

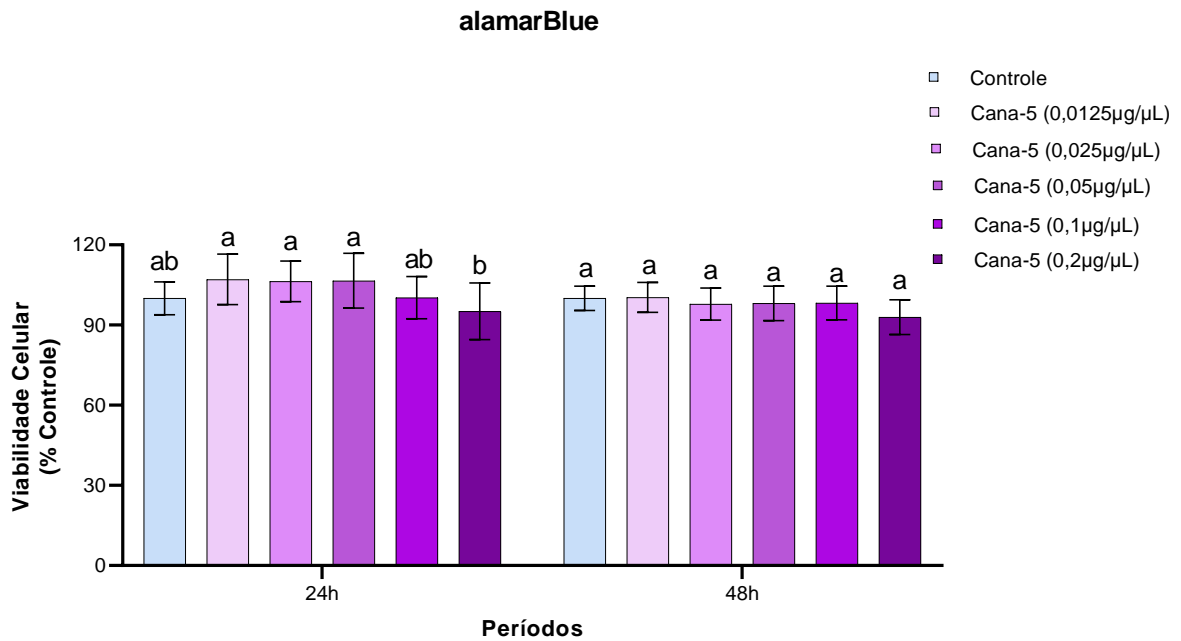
A cultura de hDPSCs expressou altas porcentagens de marcadores de células-tronco mesenquimais, sendo CD105 (83.1%); CD90 (95.4%); CD73 (98.5%); CD146 (90.0%), e baixas porcentagens dos marcadores de células hematopoiéticas, CD45 (0.2%) e CD34 (3.3%) (**Fig. 1**).



**Fig. 1** – Caracterização das hDPSCs por citometria de fluxo. Histogramas representativos da expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais (CD90, CD73, CD105, CD146) e hematopoéticos (CD45, CD34). Resultados representam uma das triplicatas.

## Viabilidade celular

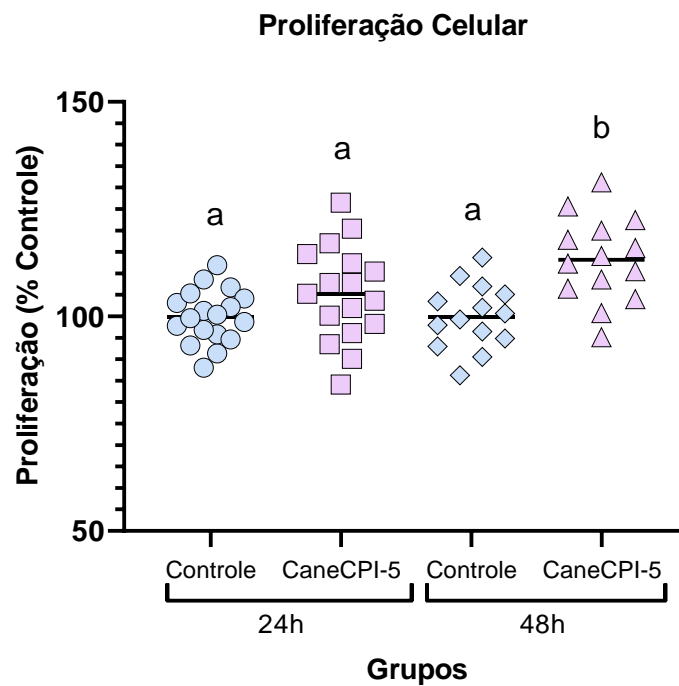
O ensaio de viabilidade celular (alamarBlue) mostrou que a CaneCPI-5 em contato com as hDPSCs, por 24 e 48 horas, não apresentou efeito citotóxico nas concentrações avaliadas, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle ( $p > 0,05$ ). Houve maior viabilidade das hDPSCs expostas à CaneCPI-5 nas concentrações de  $0,0125\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $0,025\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $0,05\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em comparação com a concentração de  $0,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p < 0,05$ ) no período de 24 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no período de 48 horas ( $p > 0,05$ ) (**Fig. 2**).



**Fig. 2** - Ensaio de alamarBlue. Viabilidade das células da polpa dental humana após exposição à diferentes concentrações da CaneCPI-5, por 24 e 48 horas, em comparação ao grupo controle (%). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey).

### Ensaio de proliferação celular

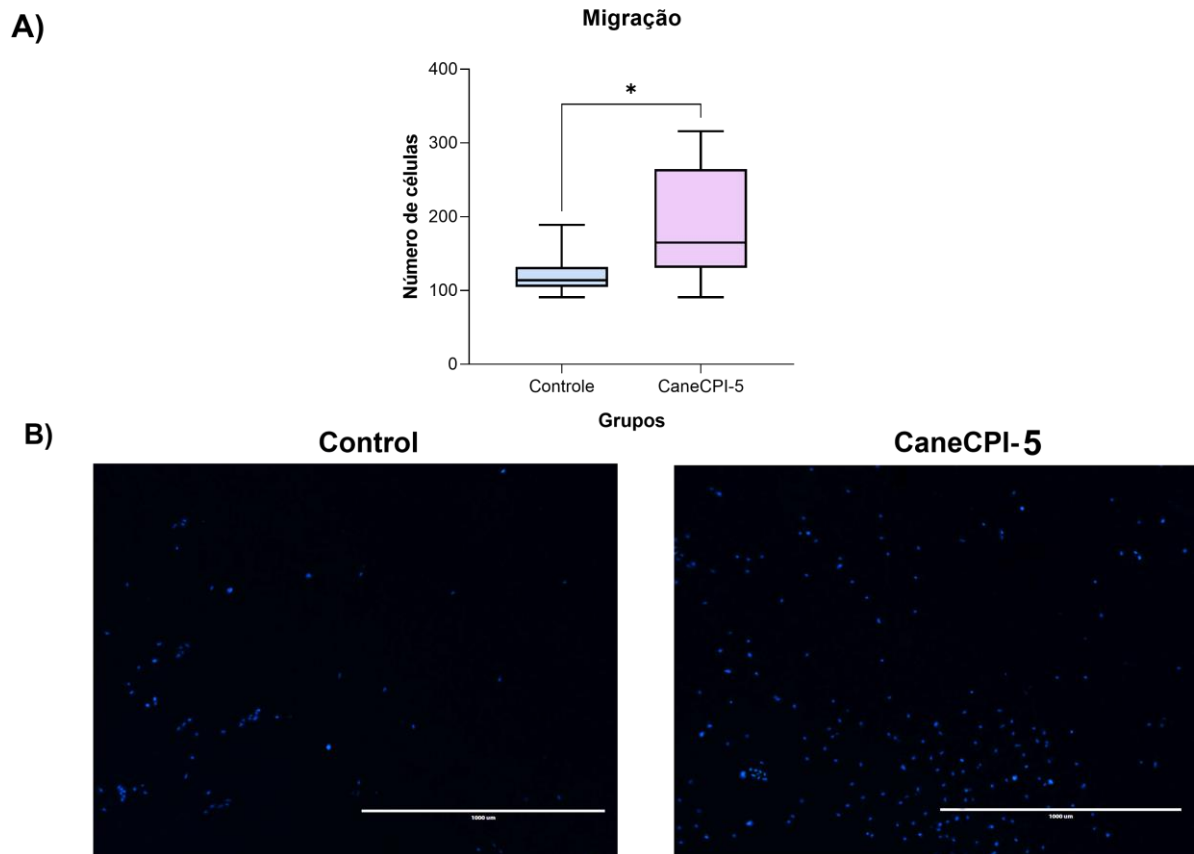
Como observado na **fig. 3**, não houve diferença entre os grupos em 24 horas ( $p > 0,05$ ). No entanto, em 48 horas houve maior proliferação das hDPSCs expostas à CaneCPI-5 do que o controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, houve maior proliferação das células expostas à CaneCPI-5 em 48 horas quando comparado à exposição por 24 horas ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 3** – Ensaio de proliferação celular. Proliferação das células pulpares humanas avaliada pelo ensaio de incorporação de BrDU nos grupos controle e CaneCPI-5 (0,05 µg/µL) nos períodos de 24 e 48 horas. Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis e Dunn).

### Ensaio de migração por *transwell*

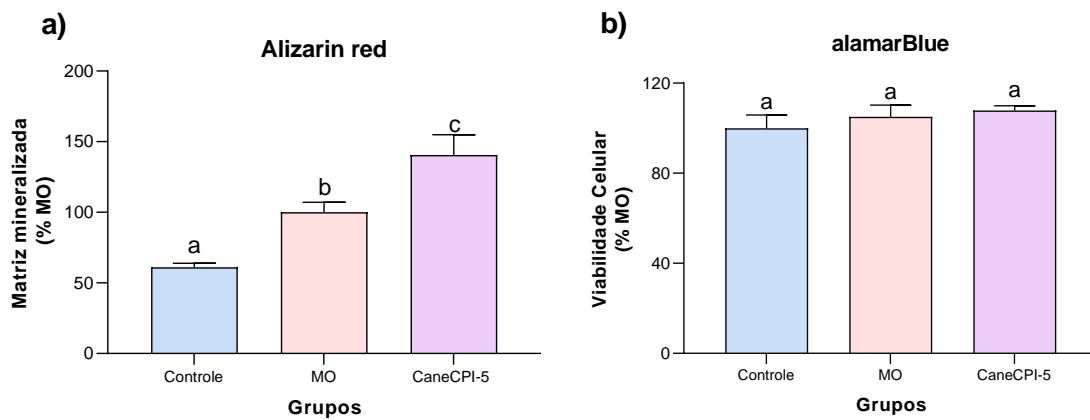
Após 24 horas de exposição, a CaneCPI-5 mostrou efeito estimulatório na migração das células; as hDPSCs tratadas com a CaneCPI-5 apresentaram maior migração para a superfície inferior da membrana da *transwell* quando comparado com as células não tratadas ( $p < 0,05$ ) (**fig. 4**).



**Fig. 4** - Ensaio de migração celular. (A) Comparação da migração celular por ensaio de transwell. O asterisco (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Mann Whitney). (B) Imagens dos núcleos das células da polpa dental humana corados com Dapi que migraram através da membrana da *transwell* (fluorescência azul dos núcleos), nos grupos controle e CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Barra = 1000 $\mu\text{m}$ .

### Coloração de vermelho de alizarina

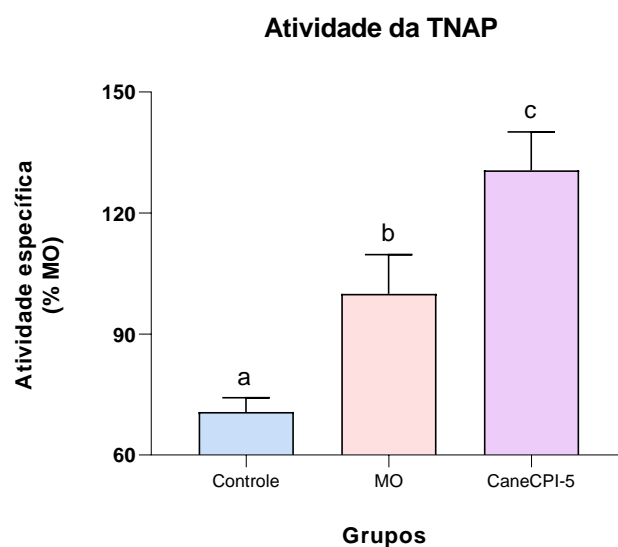
Houve maior formação de nódulos mineralizados no grupo meio osteogênico comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). A CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) mostrou efeito estimulatório significativo na formação de nódulos mineralizados ( $p < 0,0001$ ), quando comparada ao grupo meio osteogênico e ao grupo controle (**fig. 5a**). O ensaio de alamarBlue, realizado para acompanhar a viabilidade das hDPSCs durante o período de 21 dias do ensaio, mostrou que não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (**fig. 5b**).



**Fig. 5** - Ensaio de coloração de vermelho de alizarina. (A) Comparação da produção de nódulos mineralizados entre os grupos. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey). (B) Viabilidade das células da polpa dental humana avaliada por meio do teste de alamarBlue nos grupos controle, meio osteogênico (MO) e CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), no período de 21 dias.

### Atividade da fosfatase alcalina tecido inespecífica (TNAP)

Houve maior atividade de TNAP no grupo meio osteogênico comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A CaneCPI-5 (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) induziu significativa atividade da TNAP quando comparada aos grupos controle e meio osteogênico ( $p < 0,05$ ) no período de 7 dias (**fig. 6**).



**Fig.6** – Atividade da fosfatase alcalina tecido inespecífica (TNAP). Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey).

## DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citocompatibilidade e o efeito da fitocistatina CaneCPI-5 sobre a proliferação, migração e diferenciação osteogênica em hDPSCs.

A polpa dental humana é fonte de células-tronco mesenquimais (Huang et al., 2009) e, por isso, suas células constituem em um modelo in vitro adequado para avaliar o potencial de substâncias em induzir a diferenciação osteogênica e odontogênica (Lee et al., 2017; Rodrigues et al., 2017; Leguizamón et al., 2019). Um dos critérios para considerar uma célula como tronco/progenitora mesenquimal é a elevada expressão de marcadores como CD105, CD73, CD90, CD146 e, paralelamente, baixa ou não expressão de marcadores negativos como CD45 e CD34, considerados marcadores de células hematopoiéticas e/ou endoteliais (Dominici et al., 2006; Bakopoulou et al., 2016), assim como observado para a cultura empregada nos experimentos deste estudo.

A CaneCPI-5, nas concentrações de 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , não apresentou citotoxicidade, concordando com estudo anterior que mostrou que ela não foi citotóxica para fibroblastos gengivais de humanos em concentrações de 0,025 a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Pelá et al., 2021c). As células expostas às concentrações de 0,0125  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,

0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  apresentaram uma tendência de maior porcentagem de viabilidade celular que o grupo controle. A concentração 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  da CaneCPI-5 foi escolhida para ser empregada nos demais ensaios, uma vez que ela foi a maior concentração que proporcionou maior tendência de viabilidade de hDPSCs.

O processo de regeneração e reparo tecidual envolve, dentre outros fatores, a migração de células precursoras capazes de secretar matriz extracelular e sua diferenciação, para assim reestabelecer a integridade e a função do tecido lesionado (Holland et al., 2017; da Rosa et al., 2018). A CaneCPI-5 estimulou maior migração das hDPSCs que o grupo controle, avaliada por meio do ensaio de *transwell*. Outro aspecto fundamental para o reparo tecidual é a proliferação celular (Eramo et al., 2018) e, idealmente, buscam-se substâncias bioativas que favoreçam o aumento dessa propriedade (Almeida et al., 2018; Pedano et al., 2018). Neste estudo a proliferação celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de BrdU, o qual é baseado na incorporação de bromodeoxiuridina durante a síntese de DNA em células que estão se multiplicando (Kit ELISA, Roche GmbH). A proliferação das células tratadas com CaneCPI-5 não foi diferente das células controle no período de 24 horas, no entanto, no período de 48 horas a CaneCPI-5 induziu maior proliferação quando comparada ao grupo controle. Um estudo utilizando um inibidor natural de cisteína protease, cistatina C, também mostrou aumento na proliferação de células osteoblásticas de camundongo MC3T3-E1 (Yasueda et al., 2018).

A fosfatase alcalina é considerada um marcador da diferenciação osteo/odontogênica, sendo uma das principais enzimas expressas na maturação inicial de osteoblastos e odontoblastos, desempenhando um importante papel na biomineralização. A mensuração da atividade dessa enzima possibilita a avaliação da bioatividade de materiais e do potencial de promover reparo com formação de tecido mineralizado (Lee et al., 2011; Kim et al., 2014; Rathinam et al., 2016). Danjo et al. (2007) mostraram que a cistatina C, foi capaz de estimular a atividade da fosfatase alcalina em células osteoblásticas de camundongo e induzir a mineralização de nova matriz óssea em células derivadas da medula óssea *in vitro* e em culturas de calvária *ex vivo*. Ainda, uma fitocistatina (CaneCPI-1) derivada da cana-de-açúcar também teve efeito positivo na atividade dessa enzima em hDPSCs (Rodrigues et al., 2020). A CaneCPI-5 induziu maior atividade dessa enzima nas hDPSCs no período de 7 dias comparada ao grupo controle positivo (meio osteogênico).

A CaneCPI-5 apresentou potencial de induzir a diferenciação das hDPSCs em fenótipo mineralizador, uma vez que houve formação de nódulos mineralizados significativamente maior no grupo CaneCPI-5 que no grupo controle osteogênico, ao final de 21 dias. Este potencial também foi demonstrado no estudo com a CaneCPI-1, que foi capaz de induzir, *in vitro*, a diferenciação de hDPSCs em fenótipo osteogênico (Rodrigues et al., 2020).

Considerando os resultados obtidos até o momento, a CaneCPI-5 se constituiu em uma molécula com potencial para ser empregada nas técnicas de regeneração endodôntica ou reparação pulpar e periapical, processos que exigem migração, proliferação e diferenciação osteo/odontogênica de células-tronco mesenquimais. No entanto, mais estudos avaliando a expressão gênica e proteica de fatores relacionados a indução de fenótipo mineralizador, entre outros, são necessários para conhecer mais profundamente seu efeito sobre células-tronco mesenquimais, e avaliar sua aplicação. A incorporação da CaneCPI-5 em *scaffolds* ou em composto medicamentoso para ser utilizado durante o tratamento endodôntico seria interessante pois poderia contribuir para o controle da reabsorção óssea por meio da inibição das catepsinas e da atividade anti-inflamatória, bem como favorecer o reparo/regeneração pulpar e periapical, por meio da ativação de mecanismos de diferenciação oste/odontogênica.

## **CONCLUSÃO**

A CaneCPI-5 foi citocompatível, induziu migração, proliferação, assim como a atividade da enzima fosfatase alcalina tecido inespecífica e formação de nódulos mineralizados em hDPSCs. Assim, ela se constitui em molécula com potencial promissor para ser utilizada em terapias que visam o reparo/regeneração pulpar e periapical.

## **REFERÊNCIAS**

Almeida LDF, Babo PS, Silva CR, Rodrigues MT, Hebling J, Reis RL, Gomes ME. Hyaluronic acid hydrogels incorporating platelet lysate enhance human pulp cell proliferation and differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jun 14;29(6):88.

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.

Carvalho TS, Araújo TT, Ventura TMO, Dionizio A, Câmara JVF, Moraes SM, Pelá VT, Martini T, Leme JC, Derbotolli ALB, Grizzo LT, Crusca E, Shibao PYT, Marchetto R, Henrique-Silva F, Pessan JP, Buzalaf MAR. Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization. *J Dent*. 2020 Nov; 102: 103478.

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.

Da Costa Fernandes C Jr, Rodríguez VMO, Soares-Costa A, Cirelli JA, Justino DMN, Roma B, Zambuzzi WF, Faria G. Cystatin-like protein of sweet orange (CsinCPI-2) modulates pre-osteoblast differentiation via  $\beta$ -Catenin involvement. *J Mater Sci Mater Med*. 2021 Mar 22;32(4):33.

Da Ponte Leguizamón N, de Molon RS, Coletto-Nunes G, Nogueira AVB, Rocha SV, Neo-Justino DM, Soares-Costa A, Cerri PS, Lerner UH, Souza PPC, Cirelli JA. Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *J Dent Res*. 2022 Feb;101(2):216-225.

Da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018 Aug;51(8):829-846.

Derradi R, Bolean M, Simão AMS, Caseli L, Millán JL, Bottini M, Ciancaglini P, Ramos AP. Cholesterol Regulates the Incorporation and Catalytic Activity of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in DPPC Monolayers. *Langmuir*. 2019 Nov 26;35(47):15232-15241.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J*. 2018 Apr;51(4):405-419

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.

Frazão Câmara JV, Araujo TT, Mendez DAC, da Silva NDG, de Medeiros FF, Santos LA, de Souza Carvalho T, Reis FN, Martini T, Moraes SM, Shibao PYT, Groisman S, Magalhães AC, Henrique-Silva F, Buzalaf MAR. Effect of a sugarcane cystatin on the profile and viability of microcosm biofilm and on dentin demineralization. *Arch Microbiol*. 2021 Sep;203(7):4133-4139.

- 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.
- 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.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.
- 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.
- 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.
- Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48:422e7.
- 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 Sep-Oct;25(5):465-476.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
- 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):1087-1094.
- 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 May;25(5):716-23.
- Lee BN, Lee BG, Chang HS, Hwang YC, Hwang IN, Oh WM. Effects of a novel light-curable material on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2017;50(5):464-471.
- 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.
- Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J*. 2011 Oct;44(10):889-906.
- 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.

Margis R, Reis EM, Villeret V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 359(1): 24-30.

Pedano MS, Li X, Li S, Sun Z, Cokic SM, Putzeys E, Yoshihara K, Yoshida Y, Chen Z, Van Landuyt K, Van Meerbeek B. Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate human dental pulp cells. *Dent Mater*. 2018 May;34(5):797-808.

Pelá VT, Buzalaf MAR, Niemeyer SH, Baumann T, Henrique-Silva F, Toyama D, Crusca E, Marchetto R, Lussi A, Carvalho TS. Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface. *J Dent*. 2021a Apr;107:103612.

Pelá VT, Braga AS, Camiloti GD, Lunardelli JGQ, Pires JG, Toyama D, Santiago AC, Henrique-Silva F, Magalhães AC, Buzalaf MAR. Antimicrobial and anti-caries effects of a novel cystatin from sugarcane on saliva-derived multi-species biofilms. *Swiss Dent J*. 2021b May 10;131(5):410-416.

Pelá VT, Lunardelli JGQ, Tokuhara CK, Gironde CC, Silva NDG, Carvalho TS, Santiago AC, Souza BM, Moraes SM, Henrique-Silva F, Magalhães AC, Oliveira RC, Buzalaf MAR. Safety and In Situ Antierosive Effect of CaneCPI-5 on Dental Enamel. *J Dent Res*. 2021c May 10:220345211011590.

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 Dec;42(12):1713-1725.

Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J*. 2017 Aug;50(8):780-789.

Rodrigues EM, Viola KS, Gomes-Cornélio AL, Soares-Costa A, Henrique-Silva F, Rossa-Junior C, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Sugarcane cystatin CaneCPI-1 promotes osteogenic differentiation in human dental pulp cells: a new insight into cysteine proteases inhibitors. *Int Endod J*. 2020 Nov;53(11):1485-1493.

Santiago AC, Khan ZN, Miguel MC, Gironde 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.

Shibao PYT, Santos-Júnior CD, Santiago AC, Mohan C, Miguel MC, Toyama D, Vieira MAS, Narayanan S, Figueira A, Carmona AK, Schiermeyer A, Soares-Costa A, Henrique-Silva F. Sugarcane cystatins: From discovery to biotechnological applications. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jan 15;167:676-686.

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.

Szulc P. Bone turnover: Biology and assessment tools. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018 Oct;32(5):725-738.

Tremblay J, Goulet MC, Michaud D. Recombinant cystatins in plants. *Biochimie*. 2019;166:184-193.

Udenigwe CC. Towards rice bran protein utilization: In silico insight on the role of oryzacystatins in biologically-active peptide production. *Food Chem*. 2016;191:135-138.

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.

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):1027-1032.

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.

#### **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. *J Endod*. 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, Gironde 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 Biophys*. 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, Wiczak 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 sugarcane cystatin recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002; 296(5): 1194-9.
34. Oliveira AS, Xavier-Filho J, Salles MP. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives*. 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 novel cystatins-like proteins of sweet orange (*Citrus sinensis*) and clementine (*Citrus clementina*). *Int J Biol Macromol*. 2020 Jun; 152: 546-53.
38. Shiba 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 acarids. *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 Sci Ther*. 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  $\beta$ -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.

## APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA

### Expressão e purificação da proteína recombinante CaneCPI-5

A produção heteróloga da Canacistatina 5 recombinante (CaneCPI-5) foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Para tanto, foi utilizada a cepa bacteriana *Escherichia coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo pET28aCaneCPI-5, como descrito previamente<sup>1</sup>. A proteína expressa foi purificada da fração solúvel de culturas bacterianas induzidas por IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside), submetidas à centrifugação e sonicação. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade em colunas contendo resina de níquel Ni-NTA Superflow (QIAGEN, Germantown, MD, EUA). A proteína eluída da coluna foi então dialisada (3 trocas) contra tampão PBS 1X (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM e KCl 2.7 mM) pH 7,2, quantificada usando o Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e mantida em freezer -20°C até sua utilização<sup>2</sup>.

### Cultura Celular

Após aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP – FOAr (CAAE: 36595920.7.0000.5416), foram coletados terceiros molares hígidos, de dois pacientes saudáveis (19 e 21 anos), indicados para extração por motivos ortodônticos. As culturas de hDPSCs foram estabelecidas utilizando o método de dissociação enzimática<sup>3</sup>. Após a exodontia, os dentes foram lavados com solução salina tamponada de fosfato (PBS), imersos em meio de cultura  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 ug/mL) (Sigma-Aldrich) e levados para o laboratório de cultura de células. Os dentes foram desinfetados com álcool 70 INPM e os tecidos periodontais foram removidos. Em seguida, eles foram envolvidos em gaze esterilizada, inseridos em pacotes de plástico esterilizados e fraturados com o auxílio de um martelo. O tecido pulpar foi removido com pinça e/ou limas endodônticas, transferido para um microtubo de 2 mL (Axygen, Corning, New York, NY, EUA) contendo PBS e picotado em pequenos fragmentos com o auxílio de uma tesoura esterilizada. O microtubo contendo a polpa fragmentada foi centrifugado a 400g por 3 minutos a 23°C, o sobrenadante removido e foi

adicionado 1 mL de colagenase tipo I (Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, EUA) na concentração de 3 mg/mL em  $\alpha$ -MEM. Esta solução permaneceu em contato com a polpa por 1 hora a 37°C, sendo que a cada 15 minutos foi realizada agitação em vórtex. Então, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, repetindo a centrifugação a cada lavagem (400g por 5min a 23°C) e foram cultivadas em placa de 6 poços (Corning, New York, NY, EUA), contendo meio de cultura  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 ug/mL) (Sigma-Aldrich) em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Após atingirem confluência de 80%, as células foram transferidas para uma garrafa de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> de área de crescimento celular (Corning). Para realização dos ensaios foram utilizadas células da 3<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> passagem cultivadas em placas de 96, 24 ou 6 poços (Corning), contendo  $\alpha$ -MEM com FBS 10%. Os meios  $\alpha$ -MEM e  $\alpha$ -MEM osteogênico foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. O meio osteogênico é obtido a partir da suplementação do  $\alpha$ -MEM com 50µg/mL de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich) e  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich). Todos os ensaios foram realizados pelo menos duas vezes empregando de triplicata a sextuplicata.

### **Caracterização imunofenotípica das culturas de hDPSCs**

As culturas de hDPSCs foram avaliadas 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 previamente<sup>4</sup>. As hDPSCs, na terceira passagem, foram cultivadas em placas de 24 poços (9x10<sup>4</sup> células/poço) e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> 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 (Cell Dissociation Buffer - Gibco). A quantidade de células de dois poços foi coletada da placa de cultura, e transferida para um tubo de 1,5mL (Axygen®, Corning). Os tubos foram centrifugados a 500g por 5 minutos a 20°C. Em seguida, foram lavadas com PBS gelado (sem Ca e Mg), centrifugadas novamente (500g, 5 minutos a 17°C) e o pellet foi ressuscitado com 100µL de stain buffer (2% de bovine serum albumin - BSA em PBS). As células foram incubadas com os anticorpos mouse anti-human conjugados com os fluorocromos

phycoerythrin (PE) ou fluorescein isothiocyanate (FITC): CD146 PE (BD 550257 (10 $\mu$ L)), CD90-FITC (BD 555595 (1 $\mu$ L)), CD105-FITC (BD 561443 (2,5 $\mu$ L)), CD73-PE (BD 550257(10 $\mu$ L)), CD45-PE (BD 555483 (1 $\mu$ L)) e CD34-FITC (BD 555821(10 $\mu$ L)) seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Após incubação com as combinações de dois anticorpos com fluorocromos diferentes em cada tubo por 45 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, as células foram centrifugadas, o sobrenadante removido e o pellet ressuspendido com 100 $\mu$ L de stain buffer. As células foram analisadas em separador de células ativado por fluorescência - Facs (BD Biosciences FACS Verse 4C, Pharmingen).

### **Avaliação da viabilidade celular por ensaio de alamarBlue**

O ensaio de alamarBlue é baseado na incorporação de resazurina, composto ativo do reagente alamarBlue, 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 células<sup>5</sup>. Vinte e quatro horas após o plaqueamento das hDPSCs (1x10<sup>4</sup> células/poço) em placas de cultura de 96 poços, elas foram expostas à diferentes concentrações da CaneCPI-5 (0,0125  $\mu$ g/ $\mu$ L; 0,025  $\mu$ g/ $\mu$ L; 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L; 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L; 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L), meio de cultura  $\alpha$ -MEM (controle), por 24 e 48 horas. As concentrações de CaneCPI-5 foram determinadas com base em experimentos pilotos, partindo da concentração utilizada no ensaio com células MC3T3-E1. Após estes períodos, 200 $\mu$ L de uma solução de alamarBlue a 10% (Invitrogen, Life Technologies) foi adicionada em cada poço e as células foram incubadas por 3 horas. Em seguida, 100 $\mu$ L de cada poço foram colocados em outra placa para realização da leitura em leitor de fluorescência empregando comprimento de onda de 560 nm excitação e 590 nm emissão (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada comparando a fluorescência das células tratadas com cada concentração da CaneCPI-5 com o controle negativo (células não tratadas), o qual foi considerado 100%. Este ensaio foi realizado em triplicata e repetido em três momentos distintos.

A partir dos resultados de viabilidade celular obtidos no ensaio de alamarBlue, foi escolhida a concentração 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L da CaneCPI-5 para ser empregada nos demais ensaios, uma vez que ela foi a maior concentração que proporcionou maior tendência de viabilidade de hDPSCs.

### **Ensaio de proliferação celular**

Para 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.<sup>6</sup>. As hDPSCs foram plaqueadas ( $1,5 \times 10^4$  cel/poço) em placas de 96 poços. Após 24 horas, elas foram incubadas com a CaneCPI-5 ( $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e com o meio de cultura (controle) por 24 (placa 1) e 48 horas (placa 2). O volume de solução de cada poço foi de 100  $\mu\text{L}$ . Após 6 horas do tratamento das células da placa 1, e após 30 horas do tratamento das células da placa 2, 10  $\mu\text{L}$  da solução de BrDU foram adicionados em cada poço e as células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 18 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido, foram aplicados 200  $\mu\text{L}/\text{poço}$  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 anticorpo. O fixador foi removido e, então, as células foram incubadas com o anticorpo para BrDU (1:100, 100  $\mu\text{L}$  por poço) por 120 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo foi removido, os poços foram lavados 3 vezes com 200  $\mu\text{L}$  do Washing Solution (1:10) e foram adicionados 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  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). Os resultados foram representados pela porcentagem do grupo CaneCPI-5 em relação ao grupo controle. Este ensaio foi realizado em sextuplicata e repetido em três momentos diferentes.

### **Ensaio de migração celular por transwell**

A capacidade da CaneCPI-5 de induzir a migração celular foi avaliada por meio do ensaio de transwell com poro de tamanho de  $8 \mu\text{m}$  (Corning). As hDPSCs, cultivadas em garrafas para cultura, foram tripsinizadas e ressuspensas em meio  $\alpha$ -MEM com 1% de SFB e "plaqueadas" no compartimento superior da transwell (200  $\mu\text{L}$  da suspensão de células na densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço). O compartimento inferior foi preenchido com 600  $\mu\text{L}$  de meio  $\alpha$ -MEM SFB 1% com CaneCPI-5 ( $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ou SFB 1% (controle). Foram utilizadas 4 transwell por grupo. Após 24 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS, sendo aquelas 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 Dapi (1 µg/mL) (Life Technologies) por 15 minutos ao abrigo da luz. Cinco campos da transwell foram selecionados ao acaso e fotografados para análise (microscópio de fluorescência EVOS FI microscope, AMC, Bothell, WA, EUA). A análise da quantidade de células que migraram foi realizada por meio da contagem dos núcleos celulares empregando software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde - NIH, Bethesda, MD, EUA). O ensaio foi repetido 2 vezes.

### **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 hDPSCs foram plaqueadas ( $5 \times 10^3$  células/poço) em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas, as células foram expostas à CaneCPI-5 (0,05 µg/µL) em meio de cultura  $\alpha$ -MEM osteogênico, contendo ácido ascórbico (50 µg/mL) e  $\beta$ -glicerofosfato (10mM) (Sigma Aldrich) ou ao meio osteogênico (controle), os quais foram renovados a cada 48 horas, durante 21 dias. Ao final de 21 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 15 minutos, o corante foi removido e os poços foram lavados 4 vezes com 1 mL de água destilada/poço. A formação de matriz mineralizada foi visualizada em um estereomicroscópio (SZ2-ILST, Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera (E-330, Olympus). Em seguida, foram aplicados 500 µL 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 uL 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 - Mikro Win 2000). Os resultados foram representados pela porcentagem do grupo CaneCPI-5 em relação ao controle osteogênico considerado como 100%. Este ensaio foi realizado em sextuplicata e repetido em dois momentos distintos.

### **Atividade da fosfatase alcalina tecidual inespecífica (TNAP)**

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^4$  células/poço) e expostas à CaneCPI-5 ( $0,05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) diluída em meio osteogênico, ao meio osteogênico (controle positivo) ou ao meio  $\alpha$ -MEM (controle negativo), pelo período de 7 dias, sendo os meios renovados a cada 48 horas. Após os 7 dias, as células foram lavadas com tampão estoque (Tris 50mM e  $\text{MgCl}_2$  2mM, pH 7,5) e, em seguida, foi adicionado o tampão de choque osmótico (Tris-HCl 50mM,  $\text{MgSO}_4$  10mM e NaCl 0,8M, pH 7,5) para coleta e lise das células. A suspensão de células foi homogeneizada para ruptura celular suave e ultracentrifugadas a  $100.000 \times g$  por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . O *pellet* foi ressuspendido e homogeneizado no tampão estoque. Alíquotas dessa suspensão contendo a fosfatase alcalina ligada à membrana foram adicionadas ao meio reacional (solução aquosa contendo 70mM de 2-amino-2-metil-propan-1-ol (AMPOL) pH 10, 10mM de p-nitrofenil-fosfato (pNPP) e 2mM de  $\text{MgCl}_2$ ) em intervalos de tempos apropriados e as reações foram interrompidas nos mesmos intervalos de tempo com NaOH 1M. A atividade catalítica da TNAP foi monitorada por mudanças na intensidade da banda de absorção UV-Vis em 410 nm, correspondendo à formação de p-nitrofenolato (pNP-), um produto da hidrólise do pNPP catalisado por enzimas. A concentração de pNP- (absortividade molar  $17600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) foi calculada usando a lei de Lambert Beer. Os espectros foram obtidos através de um espectrofotômetro Hewlett Packard modelo 8453 UV-Vis. Os dados foram normalizados pela concentração total de proteína determinada pelo método de Hartree<sup>7</sup>, e foram expressos em porcentagem, sendo o controle osteogênico considerado 100%.

### **Análise estatística**

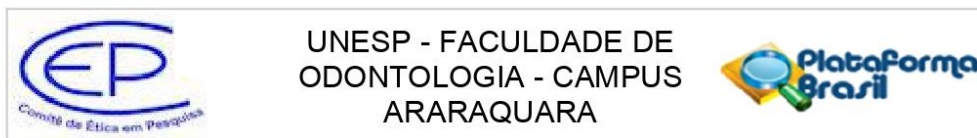
Os dados foram analisados por meio do programa estatístico GraphPadPrism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5%. Os dados foram avaliados por ANOVA de uma ou duas vias, seguido de pós-teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, ou Mann Whitney, com  $\alpha = 0,05$ .

### **Referências**

1. 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): 1194-9.

2. Santiago AC, Khan ZN, Miguel MC, Gironde 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.
3. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(25): 13625-30.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972;48:422e7.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Efeito de fitocistatina sobre células pulpares humanas

**Pesquisador:** Gisele Faria

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 36595920.7.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.351.253

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se da solicitação de Emenda acompanhada de Relatório Parcial, cujo resumo consta: "As catepsinas (um grupo de cisteíno proteases) apresentam importante papel em alguns processos patológicos. Sabe-se que um aumento da atividade das mesmas está relacionado ao desenvolvimento de doenças como a osteoporose e a periodontite apical (lesão periapical), por estimularem o processo de reabsorção óssea, através da degradação proteolítica de componentes da matriz. Portanto sua inibição poderia ser alvo terapêutico para o controle dessas doenças. As cistatinas são inibidores naturais e reversíveis de cisteíno proteases. As fitocistatinas são cistatinas de plantas e algumas delas já foram produzidas de forma recombinante, como a CaneCPI-5 (derivada da cana-de-açúcar), a qual será foco deste estudo por ter apresentado potencial próosteogênico observado em estudo preliminar do nosso grupo de pesquisa. O objetivo deste estudo será avaliar a citocompatibilidade e o efeito da CaneCPI-5 sobre a proliferação, migração, diferenciação osteo/odontogênica e capacidade de estimular mineralização de células da polpa dental humana (hDPCs). Para obtenção da cultura de hDPCs, será coletada a polpa de terceiros molares, após a extração por indicação ortodôntica, de 10 participantes de 16 a 25 anos, atendidos no Centro Cirúrgico da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (FOAr), seguindo as normas de biossegurança da FOAr. Após a coleta, a polpa será processada para a obtenção das culturas de hDPCs. As hDPCs expostas à CaneCPI-5 e não expostas (controle) serão avaliadas quanto à viabilidade celular por

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

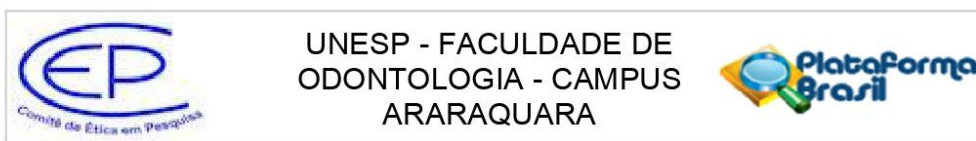
**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**CEP:** 14.801-903

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.351.253

meio dos ensaios de metiltiazol tetrazólico (MTT) e vermelho neutro, proliferação pelo ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), migração por ensaio de transwell, expressão gênica de marcadores relacionados a diferenciação osteo/odontogênica por meio de reação da polimerase em cadeia em tempo real quantitativo (qRT-PCR), atividade da fosfatase alcalina pelo cálculo da liberação timolftaleína e a detecção de precipitados inorgânicos pela coloração de vermelho de alizarina. Todos os ensaios serão realizados pelo menos duas vezes. A análise estatística dos resultados será efetuada empregando nível de significância de 5%. Os testes serão escolhidos de acordo com a distribuição e homocedasticidade dos dados.”

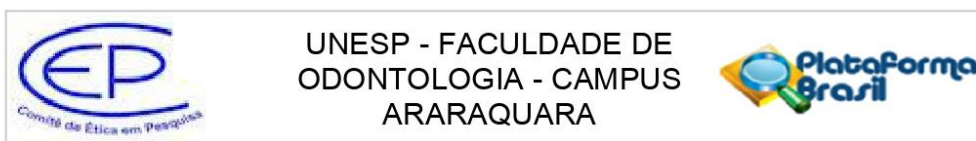
**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a citocompatibilidade e o efeito odonto/osteopromotor da fitocistatina CaneCPI-5 em células da polpa dental humana. Especificamente, serão avaliados seu efeito na viabilidade celular por meio dos ensaios de metiltiazol tetrazólico (MTT) e vermelho neutro, proliferação pelo ensaio de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), migração por ensaio de transwell, diferenciação osteo/odontogênica e mineralização por meio das análises de expressão gênica por qRT-PCR de marcadores específicos, atividade da fosfatase alcalina e coloração de vermelho de alizarina para detecção de precipitados inorgânicos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: A coleta das células da polpa dental, propriamente dita, não oferece riscos para o participante, uma vez que esta coleta será realizada após extração dentária. Há o risco de contaminação dos pesquisadores durante a coleta da polpa e expansão das culturas. No entanto, serão asseguradas as normas da Biossegurança da FOAr, incluindo o uso de gorro, máscara, luvas descartáveis, óculos, entre outros, para realização dos procedimentos laboratoriais. Em relação à extração dentária propriamente dita, ela será realizada por residentes da disciplina de Cirurgia e Traumatologia BucoMaxilo-Facial da FOAr, que são treinados para realizar o procedimento, e que seguirão as normas da Biossegurança da FOAr. Caso os participantes apresentem complicações durante a cirurgia e no pós-operatório como desconforto, inchaço (edema), sangramento continuado, dor, infecção, danos nos dentes próximos, estiramento do canto da boca (comissura labial) com consequente manchas roxas (equimose) ou laceração, restrição da abertura da boca, quebra/fratura de osso, danos ao nervo próximo ao dente e comunicação com o seio maxilar, eles serão atendidos pelos residentes, que tomarão as providências para solucionar os problemas. O risco de divulgação da identidade dos participantes será prevenido arquivando os dados em local seguro, e a divulgação dos resultados em congressos e/ou publicações em revistas científicas será feita de forma a não identificar os participantes.

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 14.801-903  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.351.253

**Benefícios:** Não haverá benefício direto para o participante, mas sim indireto. O benefício principal é que se a CaneCPI5 induzir a diferenciação osteo/odontogênica de células da polpa dental, ela poderá se constituir em uma molécula promissora para aplicações biotecnológicas, sobretudo para proteção pulpar direta e em técnicas de regeneração/reparação endodôntica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo nacional, unicentrico, experimental, laboratorial, utilizando cultura de células da polpa dental humana, provenientes de terceiros molares extraídos por indicação ortodôntica. O estudo tem caráter acadêmico, realizado para obtenção de título de mestrado de uma orientada da pesquisadora responsável.

Patrocinador: Bolsa de Mestrado FAPESP.

Número de participantes incluídos no Brasil: 10

Haverá armazenamento de amostras em banco de material biológico no Brasil para pesquisas futuras nas quais serão utilizadas células obtidas da polpa de 3º Molares, justifica-se pelo fato de que tais células permanecem viáveis, congeladas em freezer -80 °C, evitando a coleta adicional de outras polpas, o que acarretaria mais custos e tempo de trabalho.

De acordo com o cronograma, o estudo tinha previsão de início em 02/11/2020 e encerramento em 28/02/2022, contudo houve solicitação de Emenda para prorrogação do prazo de execução do estudo para 30/09/2022, justificada pela ocorrência de fatores negativos, como: interrupções das atividades de pesquisa impostas pela pandemia de COVID-19, por problemas ocorridos com a produção da proteína alvo do estudo e também com o anticorpo usado para caracterização das células, o que atrasou a realização dos ensaios.

**Critérios de inclusão:** Para a obtenção das células da polpa serão utilizados terceiros molares com rizogênese completa ou incompleta, extraídos por razões ortodônticas, que não apresentem lesão de cárie ou doença periodontal, de participantes saudáveis, com idade entre 16-25 anos.

**Critério de Exclusão:** Os tecidos da polpa dental não serão coletados de terceiros molares que apresentem lesão de cárie ou doença periodontal ou de pacientes com idade menor de 16 ou maior que 25 anos.

As Principais etapas executadas no período visando ao alcance dos objetivos são:

Execução dos ensaios de viabilidade, proliferação, migração celular e coloração de vermelho de alizarina.

Até o momento, não houve ocorrência de danos decorrentes dos riscos previstos.

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

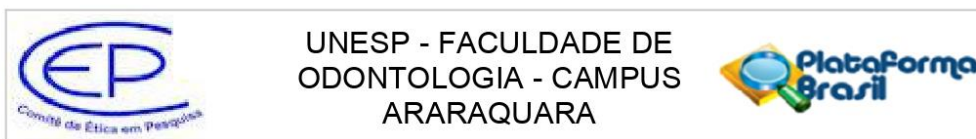
**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.351.253

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Além dos termos apresentados no Projeto inicial: Folha de Rosto, PB Informações Básicas do Projeto, Projeto de Pesquisa, Declaração do pesquisador, Cartas do laboratório de cultura de células e da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia, Termo de consentimento livre e esclarecido para maiores de 18 anos e para pais de menores, Termo de assentimento para menores, Termo de retenção de amostras, Orçamento, Cronograma da pesquisa e Carta Resposta, para a solicitação de Emenda foram apresentados os seguintes termos obrigatórios: PB Informações Básicas, Projeto de pesquisa atualizado, Cronograma atualizado, formulário para relatório parcial preenchido, Relatório Parcial contendo os resultados obtidos até o momento e discussão, bem como, carta em resposta ao parecer do CEP da FOAr 5.286.837, justificando que o relatório final referente ao CAEE 90278518.6.0000.5416 (Efeito de fitocistatinas sobre a proliferação, migração e diferenciação de células da papila apical e polpa dental humanas) foi equivocadamente inserido na página do projeto com número CAEE de 36595920.7.0000.5416.

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sugere-se a aprovação da emenda acompanhada de Relatório Parcial.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Emenda APROVADA em reunião de 14 de abril de 2022.

O pesquisador deverá encaminhar relatório parcial no meio do período da pesquisa 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_1912022_E1.pdf	28/03/2022 13:57:00		Aceito
Outros	Relatório_parcial.pdf	28/03/2022 13:54:36	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Outros	formulario_para_relatorio_parcial.doc	28/03/2022 13:50:24	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Outros	Carta_resposta_parecer.docx	28/03/2022 13:48:09	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

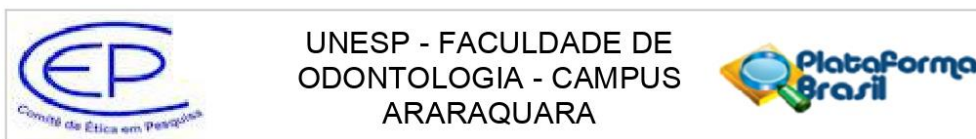
**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.351.253

Cronograma	Cronograma.docx	23/03/2022 23:02:33	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Final.pdf	16/09/2020 19:51:43	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_assentimento.docx	14/09/2020 18:13:32	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pais_responsavel.docx	14/09/2020 18:13:22	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	14/09/2020 18:13:13	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	03/08/2020 20:54:40	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_retencao_amstras.docx	03/08/2020 14:23:06	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Declaração de concordância	Carta_professor_cirurgia_traumatologia_buco_maxilo_Unesp.pdf	03/08/2020 14:15:56	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_laboratorio_cultura_de_celulas.pdf	03/08/2020 14:13:41	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisador.docx	03/08/2020 14:06:16	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	03/08/2020 14:04:00	ANA FLAVIA BALESTRERO CASSIANO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

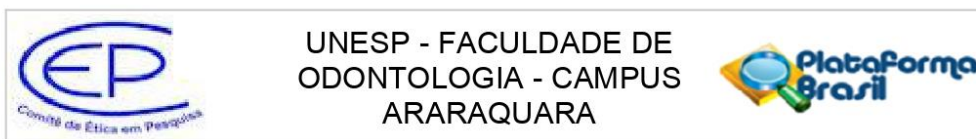
**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**CEP:** 14.801-903

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.351.253

ARARAQUARA, 14 de Abril de 2022

---

**Assinado por:**  
**Andréa Gonçalves**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**CEP:** 14.801-903

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data  
de defesa  
(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 28 de junho de 2022.**

**Ana Flávia Balestrero Cassiano**