



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



NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FITOCISTATINAS SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE CATEPSINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM
CÉLULAS RAW 264.7 DE CAMUNDONGOS E SOBRE A PRODUÇÃO DE
TNF- α EM RATOS**

Araraquara

2017



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



NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FITOCISTATINAS SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE CATEPSINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM
CÉLULAS RAW 264.7 DE CAMUNDONGOS E SOBRE A PRODUÇÃO DE
TNF- α EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: *Prof. Dr. Joni A. Cirelli*

Co-orientador: *Michel L. de Campos*

Araraquara

2017

Da Ponte Leguizamón, Natalia

Avaliação do efeito de fitocistatinas sobre a expressão gênica de catepsinas e citocinas pró-inflamatórias em células RAW 264.7 de camundongos e sobre a produção de TNF- α em ratos / Natalia Da Ponte Leguizamón.-- Araraquara: [s.n.], 2017
49 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Co-Orientador: Michel Leandro de Campos

1. Citocinas 2. Catepsinas 3. Cistatinas I. Título

NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FITOCISTATINAS SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE CATEPSINAS E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS
RAW 264.7 DE CAMUNDONGOS E SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF- α EM
RATOS

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2o Examinador: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

3o Examinador: Prof. Dr. Flavio Henrique Silva

Araraquara, 20 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES

Natalia Da Ponte Leguizamón

Nascimento	24 de julho de 1986 Asunción, Paraguay
Filiação	Jorge Luis Da Ponte Gonzalez Maria Mercedes Leguizamón Zaván
2005-2010	Graduação em Odontologia Universidad Nacional de Asunción
2011-2013	Curso de Especialização em Reabilitação Oral Universidad Nacional de Asunción
2014	Curso de Didática Universitária Universidad Nacional de Asunción
2015-2017	Pos-Graduação em Periodontia Nível mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista- UNESP

DEDICATÓRIA

A DEUS, por me orientar nos caminhos percorridos e porque ele faz as coisas acontecerem.

Aos meus avós que me iluminam sempre e me acompanham por onde quer que eu vá.

À minha família, que me dão as forças para continuar sempre na frente, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Em especial aos meus queridos pais *Jorge e Tachi*, obrigada por acreditar em mim, sempre me apoiando para conseguir atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*, agradeço o imenso conhecimento transmitido. Serei eternamente grata por ter me aceito como a sua orientada e por me ensinar sempre com entusiasmo e motivação nesse processo de aprendizado.

Ao meu co-orientador *Michel Leandro de Campos*, agradeço pela paciência e pela humildade colocada no momento de me ensinar, e pela dedicação investida durante a execução desse trabalho.

À *Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini*, pela colaboração para o desenvolvimento dessa pesquisa, e ter me recebido gentilmente no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Ao *Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva* e à *Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes* do departamento de Genética e Evolução da UFSCAR, pela colaboração nesse trabalho, que com amabilidade desenvolveram e proporcionaram as fitocistatinas utilizadas nesse projeto.

À *Andressa Vilas Boas Nogueira*, agradeço a amizade e disponibilidade para me ensinar e ajudar durante todo este tempo.

A todos meus amigos de pós-graduação, pela amizade, momentos agradáveis e alegres de convivência. Obrigada pela ajuda e apoio em todo momento.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAR-UNESP, pela oportunidade de fazer parte como aluna da instituição e de contribuir de forma importante na minha formação acadêmica e desenvolvimento profissional.

Aos professores do departamento de Periodontia da FOAR por me proporcionarem o conhecimento e práticas válidas para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da Faculdade pela amizade e por estar em dispostos a ajudar.

Ao Programa de Bercas OEA-GCUB, que a través do apoio financeiro permitiu minha formação profissional e pessoal dentro do Brasil. Obrigada pela oportunidade.

À CNPq (Processo numero 486335/2013-5) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

“It always seems impossible until it is done”

Nelson Mandela

Da Ponte Leguizamón N. Avaliação do efeito de fitocistatinas sobre a expressão gênica de catepsinas e citocinas pró-inflamatórias em células raw 264.7 de camundongos e sobre a produção de $\text{tnf-}\alpha$ em ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

As cisteíno-peptidases e as citocinas desempenham um papel importante no início e progressão dos processos imuno-inflamatórios, dentre estes, a doença periodontal. As fitocistatinas são cistatinas derivadas das plantas, inibidoras naturais das cisteíno-peptidases. Entre elas a Citrus CPI-2, derivada da laranja e a Cane CPI-4, derivada da cana-de-açúcar tem sido recentemente investigadas. O estudo das mesmas pode levar a novas terapias para o controle da doença periodontal, bem como outras doenças imuno-inflamatórias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito inibitório das fitocistatinas (Cane CPI-4 e Citrus CPI-2) sobre mediadores da inflamação. Em estudo in vitro, foi avaliado o efeito da atividade inibitória das fitocistatinas sobre a expressão gênica (RT-PCR em tempo real) das catepsinas B e K e citocinas pró-inflamatórias (IL- 1β , IL-6 e TNF- α) em células de linhagem macrofágica de camundongos (RAW 264.7), após 12 e 24h de estímulo com *Porphyromonas gingivalis* inativada por calor. Em estudo in vivo, foi avaliada a ação de diferentes concentrações das fitocistatinas sobre a produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos submetidos à injeção de LPS de *E.coli*. Todos os animais foram submetidos à implementação de cânulas na veia femoral para à injeção de LPS de *E.coli* e na artéria femoral para a extração de sangue em 6 diferentes tempos (de 30 a 180 minutos) após o estímulo com LPS de *E.coli* (IV, 100 U μ g/Kg). A quantificação de TNF- α foi realizada por teste ELISA. Os resultados in vitro demonstraram que a Citrus CPI-2 mostrou uma redução significativa na expressão gênica de catepsinas e citocinas, a Cane CPI-4 não apresentou uma redução dos genes testados. In vivo, a Citrus CPI-2 administrada IP (0,8 mg/kg) mostrou uma inibição da produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos após 60 minutos do estímulo inflamatório, enquanto a Cane CPI-4 não apresentou uma redução significativa na produção de TNF- α . Os resultados sugerem que a nova fitocistatina derivada da laranja tem potencial para aplicação terapêutica coadjuvante no tratamento da doença periodontal e deve ser investigada em estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Citocinas. Catepsinas. Cistatinas.

Da Ponte Leguizamón N. Evaluation of the effect of phytocystatins on the gene expression of cathepsins and proinflammatory cytokines in raw 264.7 of mice and the production of $\text{tnf-}\alpha$ in mouse [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

The cysteine proteinases and the cytokines play an important role in the initiation and progression of immune-inflammatory processes such as periodontal disease.

The phytocystatins are cystatins derived from plants and they are natural inhibitors of cysteine proteinases. Among them, the Citrus CPI-2 derived from orange and Cane CPI-4 derived from sugar cane have been investigated. The study of them may lead to new therapies for the control of periodontal disease and other immune inflammatory diseases. The overall objective of this study was to evaluate the effect of phytocystatins CaneCPI-4 and CitrusCPI-2 on mediators of inflammation. The aim of the in vitro study was to assess the inhibitory activity of phytocystatins on gene expression (RT-PCR) of cathepsins B and K and pro-inflammatory cytokines (IL- 1β and IL-6 and TNF- α) in murine macrophage cells (RAW 264.7) after 12 and 24 hours of stimulation with heat-inactivated bacteria *Porphyromonas gingivalis*. The aim of the in vivo study was to assess the inhibitory activity of both phytocystatins in the production of TNF- α by blood cells of rats submitted by an injection of lipopolysaccharide (LPS) of *E.coli*. All animals were subjected to the implementation of cannulas to femoral artery and vein for blood collection at 6 different time points (from 30 to 180 minutes) after LPS stimulus (IV, 100 $\mu\text{g/kg}$). Quantification of TNF- α was performed by ELISA.

According to the results of the in vitro study, Citrus CPI-2 showed a significant reduction on the gene expression of cathepsins and cytokines, the Cane CPI-4 did not show a significant reduction on the tested genes. In the in vivo study, CitrusCPI-2 administrated IP (0,8 mg/kg) inhibited the TNF- α production by blood cells of rat 60 minutes after the inflammatory stimulus, the Cane CPI-4 didnot show a significant reduction in TNF- α production. The results suggest that the novel phytocystatin orange-derived has potential for application as adjunctive therapy treatment of periondontal disease and should be investigated in future preclinical studies.

Keywords: Cytokines. Cathepsins. Cystatins.

LISTA DE ABREVIATURAS

CTSB- Catepsina B

CTSK- Catepsina K

CTSL- Catepsina L

E.COLI- Escherichia Coli

GAPDH- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

IL-1 β - interleucina-1alfa.

IL-6- interleucina-6

IL-8- interleucina-8

LPS- Lipopolissacarídeo

MMPs- Metaloproteinases da matriz

NF-K β - Fator de transcrição nuclear Kappa β

P. GINGIVALIS- Porphyromonas gingivalis

PBS- Tampão Fosfato-salino

RANKL- Receptor activador de nf-kB

SFB- Soro fetal bovino

TIMPs- Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa.

UFC- Unidade de formação de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Cisteíno Peptidases	12
2.1.1 Catepsina B	13
2.1.2 Catepsina K.....	14
2.2 Cistatinas.....	15
2.3 Citocinas.....	16
2.4 Doença Periodontal.....	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Estudo In Vitro	20
4.1.1 Desenho experimental.....	20
4.1.2 Bactérias e condições de crescimento.....	21
4.1.3 Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em Tempo Real.....	21
4.1.4 Teste de viabilidade celular	23
4.1.5 Análise estatística.....	23
4.2 Estudo In Vivo	24
4.2.1 Desenho experimental.....	24
4.2.2 Preparação de LPS de <i>E.coli</i>	26
4.2.3 Obtenção do plasma sanguíneo	26
4.2.4 Teste Elisa	26
4.2.5 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Estudo In Vitro	28
5.1.1 Citotoxicidade das fitocistatinas.....	28
5.1.2 Expressão gênica	29
5.2 Estudo In Vivo	35
5.2.1 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- α	35
5.2.2 Primeira etapa experimental.....	36
5.2.3 Segunda etapa experimental.....	37
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A	48

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica iniciada, principalmente, por bactérias anaeróbicas do biofilme dental e resulta na destruição dos tecidos de suporte dos dentes. Durante a progressão da doença periodontal observa-se um desequilíbrio do processo de saúde-doença entre bactérias periodontopatogênicas e a resposta do hospedeiro frente à agressão¹⁷. Nesta condição, muitas citocinas inflamatórias são liberadas induzindo uma perda tecidual³³. A liberação de toxinas e produtos do metabolismo microbiano estimula monócitos a secretarem mediadores inflamatórios, incluindo interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), prostaglandina E2, tromboxano B2 e colagenase. Diversos estudos demonstraram o papel desses mediadores inflamatórios na patogênese da doença periodontal. O nível de IL-1 β e TNF- α encontra-se elevado em sítios periodontalmente ativos, havendo uma redução após a realização de terapia periodontal¹²⁻⁵⁸, sendo que os altos níveis de IL-1 β estão associados aos sinais clínicos e com a severidade da doença periodontal^{36,58}. A IL-6 também apresenta papel na indução de reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar na doença periodontal^{14, 29}.

No processo de destruição do tecido conjuntivo na doença periodontal ocorre a ação de vários tipos de proteinases derivadas do hospedeiro. Estudos clínicos e in vitro têm fornecido evidências de que o processo destrutivo na periodontite é consequência do desequilíbrio da homeostase entre as enzimas degradativas, tais como, as metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs)³⁰. Este desequilíbrio também pode ocorrer na presença de outros tipos de enzimas proteolíticas, como as cisteíno proteases lisossomais, especificamente as catepsinas com os respectivos inibidores, denominados cistatinas³⁷.

As cistatinas são classificadas de acordo com as diferenças estruturais, portanto, espera-se que as diferentes cistatinas apresentem perfis específicos de atividade inibitória contra cisteíno peptidases, o entendimento da participação das cisteíno peptidases na progressão da doença periodontal pode levar a novas terapias para o controle desta doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cisteíno Peptidases

As cisteíno peptidases do tipo catepsinas, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, tais como: remodelação tecidual, turnover da matriz extracelular, funções do sistema imune, apoptose e no processamento antígeno-proteína (Dickinson et al.⁸, 2002). São enzimas que apresentam propriedades físicas e bioquímicas, distribuídas em 44 famílias (Rawlings et al.⁴⁶, 1994). Dentre todas as famílias, a família da papaína ou C1 é considerada a mais estudada. As enzimas da família C1 podem ser encontradas em plantas e animais assim como em vírus, bactérias e fungos. As cisteíno peptidases estão envolvidas em diversos processos de patogenicidade, tais como, imunoevasão por meio da degradação de proteínas envolvidas na defesa do hospedeiro, invasão celular e tecidual e obtenção de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento e crescimento (Valeuva et al.⁵⁵, 2004). Estas enzimas têm sido identificadas em bactérias como: *Streptococcus aureus* (estreptopaína) e *Porphyromonas gingivalis* (gingipaína).

Em vertebrados, as cisteíno peptidases têm a função primária de degradar, de forma não seletiva, proteínas dentro dos lisossomos. Estas enzimas podem também acumular-se em diferentes organelas e participar de processos celulares mais especializados, levando ao desenvolvimento de patologias. As cisteíno peptidases mais importantes em mamíferos são as catepsinas lisossomais (catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V e W) da família C1. Estas exercem importantes funções em processos fisiológicos, como processamento proteolítico de pró-hormônios e pró-enzimas, degradação de proteínas e apresentação de antígenos. As catepsinas lisossomais da família C1 estão presentes em vários processos patológicos como na doença de Alzheimer, osteoporose, invasão tumoral e metástase e doença periodontal (Vasiljeva et al.⁵⁶, 2007).

Sabe-se relativamente pouco no que concerne ao papel das catepsinas humanas na cavidade oral em condições de saúde e enfermidades, de modo que alguns estudos apontam para o uso potencial de enzimas lisossomais como marcadores para a atividade de doenças periodontais. A saliva humana contém altos níveis de cistatinas, potenciais inibidores de catepsinas, as quais devem ser testadas no controle da atividade de catepsinas humanas (Dickinson et al.⁸, 2002).

Em termos de regulação de atividade de catepsinas, sua inativação é imediata caso haja oxidação da cisteína do sítio ativo e requerem um ambiente redutor para ter atividade plena. Muitas catepsinas humanas são instáveis em pH neutro, requerendo pH ácido para ter atividade e, uma vez ativadas, podem perder sua atividade por degradação, por

exemplo, pela ligação de inibidores de peptidase que se liguem fortemente à enzima bloqueando o acesso ao substrato (Dickinson et al.⁸, 2002).

2.1.1 Catepsina B

A catepsina B (CTSB) é uma enzima lisossomal encontrada em células e tecidos de mamíferos e atuam principalmente na degradação intracelular de proteínas. Em determinadas circunstâncias, elas podem ser liberadas e agir extracelularmente degradando os componentes da matriz extracelular, tais como, proteoglicanas, laminina e colágeno (Dickinson et al.⁸, 2002).

A CTSB possui atividade de endopeptidase e também de exopeptidase. Como um membro da família da papaína, a CTSB apresenta similaridade de seqüência com a mesma. Contudo, a estrutura desta enzima difere quanto à presença de um segmento peptídico de aproximadamente 20 resíduos de aminoácido, denominada loop de oclusão que bloqueia a fenda do sítio ativo da enzima (Musil et al.³⁹, 1991).

A presença do loop de oclusão na CTSB é incompatível com a inibição por membros da família cistatina, inibidores protéicos reversíveis de cisteíno proteinases, uma vez que estes se ligam em ambos os subsítios S e S' da enzima (Illy et al.²⁵, 1997). A inibição só é possível por meio de um mecanismo de dois passos, o qual requer um deslocamento do loop de oclusão antes da ligação à fenda do sítio ativo (Nycander et al.⁴³, 1997). Consequentemente, a maioria dos inibidores naturais de cisteíno proteinases é muito menos efetivo contra a CTSB do que contra outros membros da família da papaína.

A catepsina B também tem sido associada à degradação do colágeno da matriz em doenças bucais como gengivites e periodontites (Kennett et al.²⁸, 1997). Experimentos de imunohistoquímica demonstraram que a CTSB está relacionada ao processo de desenvolvimento de cárie (Nascimento et al.⁴⁰, 2011; Carrilho et al.⁴, 2007). Além disso, sugere-se que a expressão da CTSB por macrófagos possa ser modulada pela inflamação (Hannaford et al.²⁰, 2013).

Alguns autores sugerem a sua utilização como um possível marcador biológico que reflete o estado clínico da doença inflamatória (Illy et al.²⁵, 1997; Valeuva et al.⁵⁵, 2004).

2.1.2 Catepsina K

A catepsina K (CTSK) é uma cisteíno-protease lisossomal a qual desempenha um papel-chave na reabsorção óssea juntamente com diversas outras cisteíno-proteases, motivo pelo qual tem emergido como alvo promissor para o tratamento de inúmeras osteopatias, tais como a osteoporose. A CTSK foi isolada inicialmente por meio de screening diferencial de bibliotecas de cDNA de osteoclastos em baço de coelhos (Barret et al.², 2004; Tezuka⁵², 1994). Foi identificada na década de 1990 como uma cisteíno peptidase similar à papaína e expressa em altos níveis nos osteoclastos (Novinec et al.⁴², 2013; Tezuka⁵², 1994).

A expressão da CTSK é observada, além dos osteoclastos (onde é predominantemente expressa), em diversos outros tipos celulares, desde linhagens hematopoiéticas e epiteliais até fibroblastos, estando também envolvida em outros processos fisiopatológicos, tais como: a regulação da adipogênese, a proteólise de tiroglobulina na glândula tireóide e a regulação de hormônios peptídicos. A atividade elevada da enzima tem sido associada com doenças como a osteoartrite, artrite reumatóide, aterosclerose, obesidade, esquizofrenia, metástase de tumores mamários e de próstata, com a invasividade de tumores pulmonares e com outras doenças inflamatórias nas articulações (Littlewood-Evans et al.³², 1997). Em odontologia, sabe-se claramente que a CTSK desempenha um papel importante em perdas ósseas durante a progressão de doença periodontal e acredita-se que ela tenha também um papel central na reabsorção óssea durante a movimentação ortodôntica. Estas condições associam-se à degradação excessiva do colágeno do tipo I residente nos ossos e que constitui aproximadamente 90% da matriz óssea orgânica, e do colágeno do tipo II residente nas cartilagens (Hou et al.²², 1999; Novinec et al.⁴², 2013).

Fuller et al.¹¹ (2008), demonstraram que inibidores da CTSK promoveram aumento na liberação da proteína morfogenética 2 (BMP2-2), umas das principais proteínas envolvida na formação ectópica de osso e cartilagem, além de participação nos processos de proliferação, desenvolvimento e controle da diferenciação celular (Martin et al.³⁵, 2005; Scheufler et al.⁴⁹, 1999).

2.2 Cistatinas

As cistatinas são inibidores reversíveis da cisteína peptidases e o seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva por meio do bloqueio da atividade proteolítica (Abrahamson¹, 1993). As cistatinas são proteínas evolutivamente relacionadas e agrupadas na “superfamília cistatina”. Membros desta superfamília são classificados em quatro famílias de cistatinas. Três de origem animal e uma da família de cistatinas de plantas (Margis et al.³⁴, 1998). A família 1, ou família das estefinas, é uma cistatina intracelular presente no citosol de muitos tipos celulares, mas também localizado nos fluidos do corpo em concentrações significantes. Geralmente são citosólicas (Turk, Bode⁵³, 1991). A família 2, ou família cistatina, são principalmente polipéptidos secretados extracelulares, sintetizados com um péptido sinal de 19 a 28 resíduos e é amplamente distribuída e encontrada na maioria dos fluidos corporais. Estas cistatinas contêm uma sequência sinal e são secretadas (Reis, Margis⁴⁷, 2001). Na família 3, ou família cininogênio, estão os cininogênios do plasma sanguíneo, que são as cistatinas com massas moleculares mais altas (60 a 120 kDa). Estas formam pontes dissulfetos, são glicosiladas e secretadas (Turk, Bode⁵³, 1991). A família 4, ou família das fitocistatinas, contêm os inibidores de cisteína peptidases de plantas (Margis et al.³⁴, 1998). As fitocistatinas estão envolvidas na regulação da atividade das proteases endógenas durante a maturação de sementes, e na defesa contra cisteína proteinases exógenas de insetos. A identificação de novas fitocistatinas é facilitada pela disponibilidade de bancos de ESTs (*expressed sequence tag*) originados em projetos de sequenciamento em grande escala. Reis e Margis⁴⁷(2001) identificaram, por meio do projeto genoma da cana-de-açúcar, 25 *clusters* para fitocistatinas, classificados em 4 grupos. Estas proteínas inibem, principalmente, as enzimas pertencentes à família C1 (papaína), a família C13 (legumaína) e a CTSB (Nycander et al.⁴³, 1997).

A primeira cistatina derivada da cana-de-açúcar foi caracterizada e denominada Canacistatina (CaneCPI-1). Este inibidor produzido de forma recombinante (Soares-Costa et al.⁵¹, 2002) mostrou-se eficiente na inibição de catepsinas humanas, assim como outras cisteína peptidases (Oliva et al.⁴⁵, 2004). Desde que as cistatinas são classificadas de acordo com as diferenças estruturais, espera-se que as diferentes cistatinas apresentem perfis específicos de atividade inibitória contra cisteína proteinases, como por exemplo, as catepsinas. Gianotti et al. (2006)¹⁵ caracterizaram as cistatinas derivadas da cana-de-açúcar de CaneCPI-1, CaneCPI-2 e CaneCPI-3.

A cistatina derivada da laranja e denominada CitrusCPI-2, de *Citrus sinensis* foi clonada em vetor pET28a (+) e expressa em bactérias *Escherichia coli* cepa Rosetta BL21 (DE3). A proteína recombinante de CitrusCPI-2 é expressa com massa molecular de 12 kDa e foi purificada em cromatografia de afinidade em resina de níquel. É uma nova fitocistatina que ainda não tem dados publicados mais se espera que atue como inibidor das cisteíno peptidases.

Ambas as fitocistatinas utilizadas neste estudo, Citrus CPI-2 e Cane CPI-4, foram desenvolvidas no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos- UFSCAR.

2.3 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas solúveis produzidas por células, elas alteram o comportamento ou propriedade de outras células locais ou sistêmicas. Entre elas incluem o grupo de interleucinas que desempenham um papel importante em numerosas atividades biológicas como proliferação, diferenciação, homeostase, regeneração, reparação e inflamação (Okada, Murakami⁴⁴, 1998)

São denominadas citocinas inflamatória: IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF- α . Estas estão presentes em alta concentração nos tecidos periodontais doentes, e em outras doenças imuno-inflamatórias como artrites reumatóide, sepse, doença inflamatória intestinal (Beck et al.³, 2002; Okada, Murakami⁴⁴, 1998). Além de promover a inflamação, estas citocinas são capazes de mediar diretamente a destruição do osso e do cartilagem (Beck et al.³, 2002), através da estimulação de mediadores inflamatórios, estimulação da adesão molecular, aumento da formação e atividade dos osteoclastos e indução de expressão da matriz metaloproteinase (Graves et al.¹⁹, 2003).

IL-1 e TNF- α são produzidas por muitos tipos celulares como monócitos, macrófagos, leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais e por osteoblastos; contribuindo em muitos eventos que são essenciais para o início da resposta inflamatória e para a destruição tecidual (Graves et al.¹⁹, 2003).

O TNF- α induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias; podendo ser utilizada como alvo terapêutico para tratamento da dor, inchaço e destruição progressiva das articulações causada pela artrite reumatoide (Conway et al.⁶, 2001). TNF- α foi encontrado em níveis elevados no fluido crevicular gengival e no tecido periodontal, e estudos experimentais demonstraram o papel central de TNF- α na reabsorção alveolar

óssea (Yucel et al.⁵⁷, 2003).

2.4 Doença Periodontal

Sabe-se que a placa bacteriana desencadeia os eventos que resultam em alterações no tecido conjuntivo, caracterizando a gengivite e a periodontite em humanos. Enzimas e endotoxinas bacterianas estimulam os mecanismos de defesa do hospedeiro caracterizados pela ativação do sistema complemento, pela formação de complexo antígeno-anticorpo e pela migração de células fagocitárias para o ambiente intrasulcular composto por fluido ácido de alto conteúdo protéico. Contudo, em condições inflamatórias, gengivite, o pH eleva-se acima de 7.0. Consequentemente, o aumento do pH do meio, favorece a evolução do processo inflamatório (Madiados et al.³³, 2005). Devido à atividade das células fagocitárias, macrófagos e fibroblastos, ocorre a produção de grandes quantidades de proteases lisossomais capazes de degradar componentes da matriz extracelular, a qual está intimamente relacionada com a perda óssea observada na doença periodontal (Kubota et al.³⁰, 2008).

Em amostras do fluido gengival crevicular de dentes de pacientes com periodontite crônica, a atividade da cisteína peptidase do tipo CTSB apresenta correlações com parâmetros clínicos e com a severidade da doença em estudos transversais e pós-tratamento em comparação com diferentes proteases (Cox, Eley⁷, 1992; Eley, Cox⁹, 1992). Estudos longitudinais tem demonstrado associação da atividade desta cisteína peptidase com perda de inserção e perda óssea, indicando que a CTSB no fluido gengival pode atuar como marcador da progressão da doença periodontal (Eley, Cox⁹, 1992).

Da mesma forma, a concentração da CTSB no fluido gengival e o valor clínico, podem ser reduzidos pela presença de inibidores endógenos. Inibidores específicos de cisteína proteases da família da cistatina tem sido observados tanto nos tecidos gengivais (Kenett et al.²⁷, 1995) quanto no fluido gengival (Ichimaru et al.²⁴, 1992). Chen et al.⁵ (1998) constataram grande quantidade de cisteína proteases em sítios periodontais antes do tratamento periodontal, e uma diminuição significativa nos níveis de CTSB no fluido gengival após terapia periodontal. Os autores observaram uma forte correlação deste com os parâmetros clínicos, antes e depois do tratamento.

Nos tecidos gengivais de pacientes comprometidos periodontalmente, as CTSB e catepsina L (CTSL) podem ser localizadas nos fibroblastos gengivais (Kenett et al.²⁷,

1995). Ao mesmo tempo, estudos identificaram a CTSB em fibras colágenas adjacentes aos fibroblastos, no tecido gengival inflamado (Kennett et al.²⁶, 1994; Kennett et al.²⁸, 1997). Outros autores mostraram que as citocinas pró- inflamatórias podem estimular a secreção de CTSB e CTSL pelos fibroblastos gengivais como pró-enzimas (Huet et al.²³, 1993). Eley e Cox¹⁰ (1996) determinaram a relação entre a atividade da CTSB no fluido gengival e a concentração da mesma e o nível de inserção periodontal e óssea em um estudo longitudinal de dois anos. Os autores concluíram que os valores e a concentração da catepsina B no fluido gengival pode ser um forte indicativo de evolução da doença.

A CTSK, que é capaz de hidrolisar proteínas da matriz óssea extracelular, é altamente expressa em osteoclastos, sendo conhecida como marcadora da atividade dos osteoclastos (Mogi, Ootogoto³⁷, 2007). Em na doença periodontal, as células involucradas no processo inflamatório induzem a expressão de muitas citocinas, incluindo o receptor ativador de nf-kB (RANKL) (Hao et al.²¹, 2015).

A função da CTSK na doença periodontal ainda não foi caracterizada. Porém, um estudo para prevenir a inflamação e a erosão ossea em artrite reumatoide e periodontite revelou que a deleção da CTSK em camundongos causou uma redução da inflamação e da erosão óssea dentro das cápsulas articulare em animais com artrite reumatoide. Nas lesões periodontais mostraram uma diminuição da infiltração de células imunes e uma redução significativa nos osteoclastos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. A deficiência de CTSK diminuiu significativamente a expressão de Toll-like receptors 4, 5 e 9 e suas citocinas descendentes em lesões epiteliais gengivais periodontais (Hao et al.²¹, 2015).

Mogi e Ootogoto³⁷ (2007) constataram a presença de CTSK e de RANKL no fluido crevicular gengival de pacientes saudáveis, e um aumento significativo na concentração destas moléculas em pacientes com periodontite. Outro estudo demonstrou níveis elevados da CTSK no fluido crevicular gengival na presença de doença periodontal, e uma redução destes níveis depois do tratamento periodontal não cirúrgico (Garg et al.¹³, 2009).

Sendo assim, a CTSK, considerada marcador da atividade dos osteoclastos, também pode ser considerada como alvo terapêutico (Garg et al.¹³, 2009).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito inibitório das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus CPI-2 sobre mediadores da inflamação.

3.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar in vitro o efeito da atividade inibitória das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus CPI-2 sobre a expressão gênica das CTSB e CTSK e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em células de linhagem macrofágica de camundongos (RAW 264.7) estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) de *Eschericia coli* (*E. coli*) e com a bactéria *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) inativada por calor.

2. Avaliar in vivo a ação das fitocistatinas (Cane CPI-4 e a Citrus CPI-2) sobre a produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos submetidos à injeção de LPS de *E.coli*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo In Vitro

4.1.1 Desenho experimental

Foram utilizadas células macrofágicas obtidas de linhagem celular de camundongos, RAW 264.7 (disponível no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da FOAr-UNESP), mantidas em meio de cultura α -MEM completo com reduzida concentração de bicarbonato de sódio (1,5 g/L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina, a 37°C em atmosfera umedecida e 5% de CO₂. As células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo meio α -MEM completo até atingir 80% de confluência da área de cultivo. Em seguida, previamente a cada experimento, foi feito a desindução em α -MEM contendo 0,3% de SFB com o intuito de evitar a interferência de componentes do SFB na resposta das células ao tratamento. Foram realizados os seguintes experimentos:

A) Avaliação da Citotoxicidade das fitocistatinas: Após 8 horas da desindução, as células foram tratadas com diferentes concentrações das fitocistatinas Citrus CPI-2 (12kDa): 0,022 μ g/ μ l, 0,045 μ g/ μ l, 0,090 μ g/ μ l e 0,135 μ g/ μ l e; Cane CPI-4 (10,8 kDa): 7.10⁻⁵ug/ul, 35.10⁻⁵ug/ul, 70.10⁻⁵ug/ul para avaliação da citotoxicidade celular. utilizando o kit Alamar Blue (Thermo Fischer Scientific), no período de 24 horas após estímulo celular, segundo as orientações do fabricante. Como controle, células foram tratadas apenas com o veículo de diluição das fitocistatinas (PBS).

B) Seleção do estímulo inflamatório: Após 8 horas da desindução das células, conforme descrito acima, as células foram tratadas com LPS de *E. coli* (1 μ g/mL -Sigma Chem Co.) ou com a bactéria *P. gingivalis* ATCC 33277 inativada por calor, nas concentrações de 10⁷ UFC/ml (unidade formadora de colônia/mililitro) e 10⁸ UFC/ml para avaliação da indução da expressão gênica das catepsinas B e K e da citocinas pró-inflamatória TNF- α de acordo com o tempo de 6, 12 e 24 horas. Como grupo controle foi utilizado as mesmas células sem nenhum tratamento. A partir deste experimento, selecionou-se o melhor estímulo inflamatório a ser utilizado nos experimentos seguintes.

C) Avaliação da atividade inibitória das fitocistatinas: Após definir o melhor estímulo inflamatório a ser usado, bem como as concentrações não citotóxicas das fitocistatinas, foram realizados os experimentos para avaliação inibitória das fitocistatinas sobre a expressão gênica das CTSB e CTSK e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e

TNF- α). Inicialmente, após a desindução, as células foram estimuladas pelo estímulo inflamatório selecionado no experimento (B) e após 30 minutos, três diferentes concentrações de cada fitocistatina foram adicionadas ao meio de cultura dos poços denominados grupos testes. Cada concentração foi utilizada em duplicata. Como controle negativo, as células foram estimuladas com o estímulo inflamatório e 30 minutos após, tratadas apenas com o veículo de diluição das fitocistatinas (PBS). Após 12 e 24 horas as células de todos os grupos foram coletadas para avaliação da expressão gênica das catepsinas B e K e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α). Os experimentos foram realizados em triplicata. (n=6)

4.1.2 Bactérias e condições de crescimento

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) ATCC 33277 inativadas pelo calor a 98°C por 10 minutos⁴³, foi utilizada para estimular as células macrofágicas RAW 264.7 e induzir uma reação inflamatória imitando a condição inflamatória da doença periodontal. As bactérias foram cultivadas em meio de cultura de ágar sangue (Brain Heart Infusion - BHI - Acumedia) com adição de hemina (10 μ g/mL) e menadione (5 μ g/mL), e mantidas em condições anaeróbicas (85% de N₂, 10% de H₂, 5% de CO₂) (Don Whitley) a 37 ° C, de acordo com as condições fisiológicas. A curva de crescimento da *P. gingivalis* foi realizada para conhecer a fase log ou exponencial, determinar a densidade óptica e conhecer a concentração dos microrganismos em UFC/ml. Nesta etapa, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando os constituintes, crescendo e se duplicando. O momento que antecede a fase estacionária dos microrganismos, na curva de crescimento, corresponde ao período de incubação das bactérias em meio de cultura em caldo, para posterior, inativação.

4.1.3 Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR em Tempo Real

Para a avaliação da expressão de mRNA das catepsinas B e K e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) nas células macrofágicas RAW 264.7 pela técnica de PCR em tempo real, o RNA total das células foi extraído com o kit RNAqueous-4PCR, segundo as instruções do fabricante (Ambion, Inc). A quantidade e pureza do RNA foi determinada em espectrofotômetro de luz UV (NanoVue – G&E) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm,

respectivamente. RNA total foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA) na reação de transcriptase reversa (RT), que foi realizada em termociclador (MyCycler – Bio-Rad), utilizando o kit TaqMan Reverse Transcription Reagents. (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, com 1 µg do produto da reação de RT foi realizada a reação de PCR em tempo real, para a quantificação dos níveis de mRNA utilizando o equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) e o sistema TaqMan de quantificação fluorescente (Applied Biosystems). Para um volume total de reação de 20µl foram utilizados 10µl de TaqMan gene expression master mix e 1 µl de TaqMan gene expression assay para os genes alvo de camundongo. Como controle endógeno, foi utilizado o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), cuja expressão não se altera com a indução da doença. O nível de expressão de GAPDH na amostra foi utilizado para o cálculo do nível relativo da expressão gênica. Para a expressão dos resultados foi utilizado o método de ciclo limite (Ct ou Cycle Threshold).

Os genes alvos, Assay ID #, Acession # e amplicon de cada TaqMan Gene Expression Assay estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Informações sobre os conjuntos de primers TaqMan pré-otimizados para PCR em Tempo Real (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems)

Gene alvo	Assay ID	Acession #	Amplicon (bp)
Ctsb	Mm01310506_m1	NM_007798.3	94
Ctsk	Mm00484039_m1	NM_007802.4	73
Gapdh	Mm99999915_g1	NM_001289726.1	109
TNF- α	Mm00443259_g1	NM_013693.3	74
IL-1 β	Mm01336189_m1	NM_008361.3	63
IL-6	Mm00446191_m1	NM_031168.1	124

Fonte: Elaboração própria

4.1.4 Teste de viabilidade celular

O Alamar Blue (Therm Fischer Scientific) foi utilizado como indicador de viabilidade celular medido através da fluorescência do reagente quando em contato com células viáveis. Para a realização do teste, as células foram plaqueadas em placa de 48 poços, sendo 9×10^3 células por poço. Foram testadas várias concentrações dos 2 tipos de fitocistatinas usadas no presente estudo. A leitura de fluorescência foi feita 24 horas após o estímulo com as fitocistatinas. Para isso, todo meio de cultura da placa foi removido e, em seguida, 300 μ l de meio α -MEM 0,3% contendo 10% de *Alamar Blue* foi adicionado. Após 2 a 5 minutos, foram coletados 150 μ l do meio de cada poço e transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância das amostras foi lida em leitor de ELISA utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, EUA).

4.1.5 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos a um teste estatístico para comparação intra e inter-grupos de análise de variância One-way Anova, seguido do teste *pos-hoc* de Tukey. Em todos os procedimentos foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada

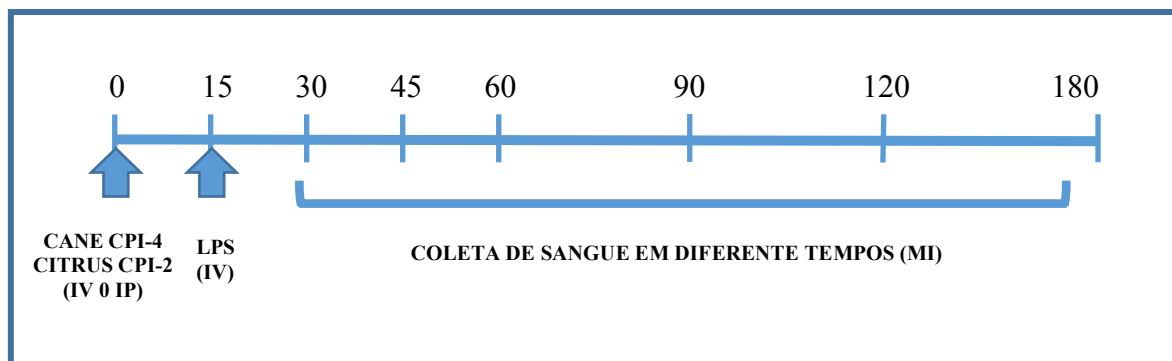
4.2 Estudo In Vivo

4.2.1 Desenho experimental

Foram utilizados 50 ratos Wistar (provenientes do Biotério Central do Campus da Unesp de Botucatu-SP), machos, adultos, entre 240 e 280 g., mantidos no Biotério do Laboratório de Toxicologia no Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno e receberam alimentação granulada e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP do Campus de Araraquara (#43/2015 – Anexo A).

Os animais foram submetidos à implantação de cânulas na artéria e veia femorais. A cânula na veia femoral foi utilizada para a administração do LPS de *E.coli* e do fármaco, a cânula na artéria femoral foi utilizada para a coleta de sangue em diferentes tempos. As fitocistatinas (Cane CPI-4 e a Citrus CPI-2) e o veículo (PBS) foram administrados pela via intraperitoneal (IP) ou via intravenosa (IV), enquanto o LPS de *E.coli* foi administrado pela cânula implantada na veia femoral (IV - 100µg/kg). Em tempos pré-determinados foi feita a coleta de amostras de sangue pela cânula na artéria femoral, para posterior quantificação da citocina pró-inflamatória TNF- α por ELISA. As coletas de sangue foram realizadas em 6 tempos diferentes. No baseline (tempo 0) foi feita a administração da fitocistatina, com concentração e via de administração de acordo com os grupos descritos abaixo. Quinze minutos após, foi realizada a administração do LPS (IV), nos grupos determinados, com objetivo de induzir estímulo pró-inflamatório e, consequentemente, a produção de TNF- α por células de defesa do sangue. Aos 30 minutos foi realizada a primeira coleta de sangue, repetida nos períodos de 45, 60, 90, 120 e 180 minutos (Figura 1). O volume total coletado por animal foi apenas o volume necessário para os ensaios ELISA, mas sempre se respeitando o máximo de 1% do peso corpóreo do animal.

Figura 1 - Tempo em minutos de administração de fitocistatinas e LPS e coleta de sangue



Tempos de administração das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus via IV e IP no minuto 0 (baseline), seguido pela administração de LPS (IV - 100µg/kg) aos 15 minutos e coletas de sangue em diferentes tempos (30, 45, 60, 90, 120, 180 minutos).

Fonte: Elaboração própria

O experimento contou com 10 grupos (n=5/grupo) divididos em duas etapas, conforme descrito abaixo:

A) Primeira Etapa Experimental:

Grupo 1- Veículo IP: Foi administrado apenas o veículo (PBS / 1 ml/kg) via IP no mesmo volume do grupo tratado com fitocistatina;

Grupo 2- Veículo IP + LPS: Foi administrado o veículo via IP no mesmo volume do grupo tratado com fitocistatina, seguido pelo LPS de *E.coli* em tampão PBS IV;

Grupo 3- Fitocistatina Cane CPI-4 IV + LPS: tratados com 5 mg de Cane CPI-4 por kg pela via intravenosa, seguido pelo LPS também pela via intravenosa;

Grupo 4- Fitocistatina Cane CPI-4 IP + LPS: tratados com 5 mg de Cane CPI-4 por kg pela via intraperitoneal, seguido pelo LPS pela via intravenosa;

Grupo 5- Fitocistatina Citrus IV + LPS: tratados com 0,82 mg/kg de Citrus CPI-2 pela via intravenosa, seguido pelo LPS também pela via intravenosa;

Grupo 6- Fitocistatina Citrus IP + LPS: tratados com 0,82 mg/kg de Citrus CPI-2 pela via intraperitoneal, seguido pelo LPS pela via intravenosa.

B) Segunda Etapa Experimental: foi definida de acordo aos resultados da primeira etapa do primeiro experimento. Nesta etapa foi utilizada apenas a Citrus CPI-2, que mostrou melhor eficácia, pela via intraperitoneal (IP), por ser a via mais acessível para estudos futuros de eficácia terapêutica do fármaco, que exigirão repetidas aplicações. Foram testadas nesta etapa três diferentes concentrações, de acordo com os grupos descritos abaixo. As coletas de sangue foram efetuadas nos mesmos períodos do experimento 1.

Os grupos da segunda etapa experimental foram os seguintes:

Grupo 1- Veículo IP + LPS: Foi administrado o veículo IP no mesmo volume do grupo tratado com Citrus, seguido pelo LPS em tampão PBS pela via intravenosa.;

Grupo 2- Citrus IP (0,4 mg/kg) + LPS;

Grupo 3- Citrus IP (1,6 mg/kg) + LPS;

Grupo 4- Citrus IP (3,2 mg/kg) + LPS.

4.2.2 Preparação de LPS de *E.coli*

A solução de LPS (*E. coli* O111: B4, #Lote# B59097, Aldrich-Sigma) foi preparada com uma solução de tampão fosfato salino (PBS, pH 7.2 a 7.4) na concentração de 2mg/ml.

4.2.3 Obtenção do plasma sanguíneo

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 1,5 mL, usando 25 µl de Heparina Sódica 5.000 U.I./mL (Hepamax-S, Blau) em cada tubo como anticoagulante. Depois as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma sanguíneo. As amostras do plasmas foram congeladas no freezer -20 °C para posterior realização das análises.

4.2.4 Teste Elisa

Para a detecção da citocina pró-inflamatória TNF- α nas amostras, foi utilizado o Kit *Rat TNF alpha ELISA Kit*, segundo as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). Foi utilizada uma curva padrão entre 7,8 ng/ml e 2000 ng/ml. A absorbância foi determinada utilizando uma leitora de ELISA (microplate reader, VERSA max; Molecular Devices) a 450 nm com correção do comprimento de onda para 540 nm.

4.2.5 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos a um teste estatístico para comparação intra e inter-grupos de análise univariado – Kruskal-Wallis seguido do teste *pos-hoc* de Dunn's. Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada.

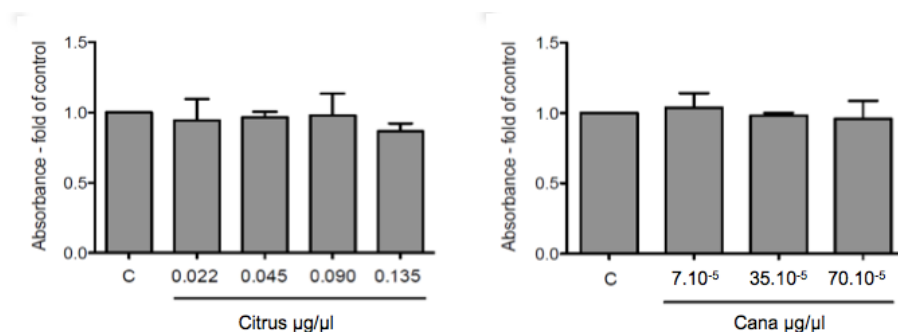
5 RESULTADOS

5.1 Estudo In Vitro

5.1.1 Citotoxicidade das fitocistatinas

Foi utilizado o reagente Alamar Blue (Invitrogrem) como indicador de viabilidade celular. O corante Alamar Blue é um indicador redox que produz uma mudança colorimétrica e uma sinal fluorescente em resposta à atividade metabólica das células RAW 264.7. Foram testadas as 2 fitocistatinas: Citrus CPI-2 (0,022 ug/ul, 0,045 ug/ul, 0,090 ug/ul, 0,135 ug/ul) e Cane CPI-4 ($7 \cdot 10^{-5}$ ug/ul, $35 \cdot 10^{-5}$ ug/ul, $70 \cdot 10^{-5}$ ug/ul). A leitura de fluorescência foi feita 24 horas após o estímulo com as fitocistatinas. A análise do estudo demonstra que nenhuma das fitocistatinas apresentou toxicidade celular, apresentando valores de redução próximos do grupo controle, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 2).

Figura 2 - Citotoxicidade das fitocistatinas



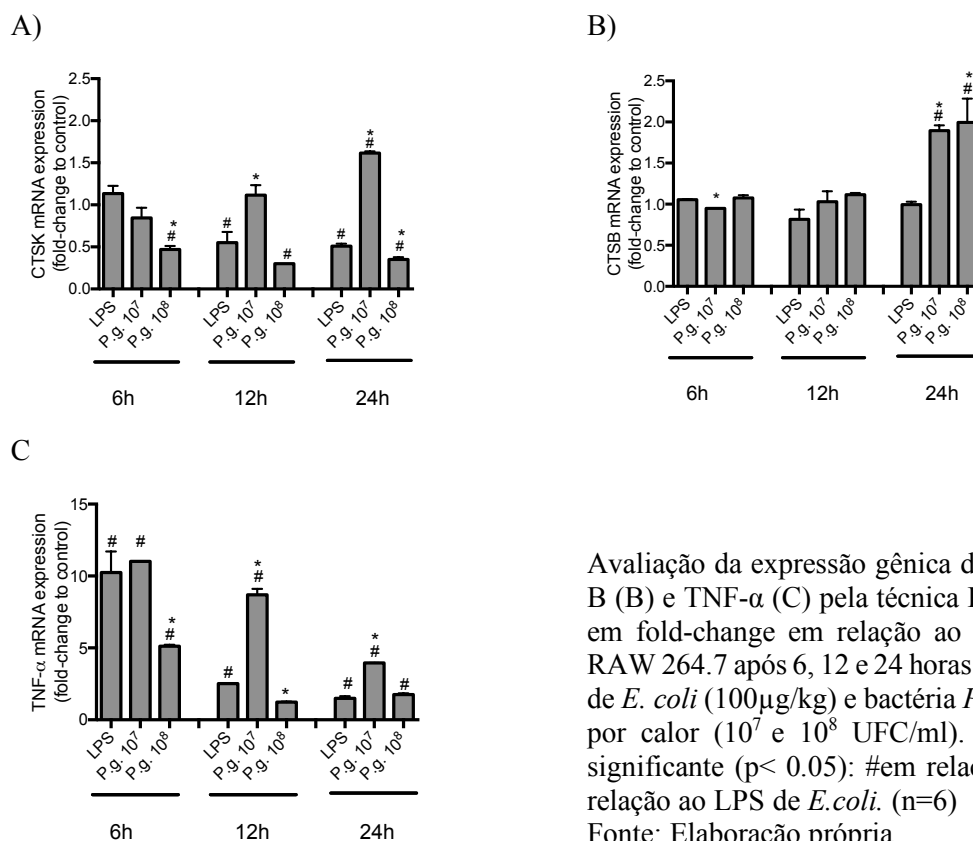
Avaliação da viabilidade celular das células RAW 264.7, 24 horas após a adição de diferentes concentrações das fitocistatinas Citrus CPI-2 e Cane CPI-4.

Fonte: Elaboração própria

5.1.2 Expressão gênica

A) Seleção do estímulo inflamatório: As células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS de *E. coli* (100µg/kg) e bactéria *P. gingivalis* inativada por calor (10^7 e 10^8 UFC/ml) para definição do melhor estímulo pró-inflamatório, avaliado nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o estímulo. A bactéria *P. gingivalis* inativada por calor (10^7 UFC/ml) induziu uma maior expressão da Catepsina K (CTSK) após 12 e 24 horas de estímulo, enquanto que os estímulos com LPS de *E.coli* e *P. gingivalis* inativada por calor (10^8 UFC/ml) apresentaram uma menor expressão da molécula comparada com o grupo controle após 12 e 24 horas. Quanto à Catepsina B (CTSB), *P. gingivalis* inativada por calor (10^7 UFC/ml e 10^8 UFC/ml) induziu uma maior expressão da molécula após 24 horas de estímulo, diferente do grupo estimulado com LPS de *E.coli* que não apresentou diferença com o grupo controle em nenhum período. A citocina TNF- α apresentou uma elevada expressão gênica após 6, 12 e 24 horas com todos os estímulos, exceto *P.gingivales* 10^8 UFC/ml no tempo de 12 horas, porém a maior expressão foi induzida pela bactéria *P. gingivalis* inativada por calor (10^7 UFC/ml) em todos os tempos (Figura 3).

Figura 3 - Seleção do estímulo inflamatório

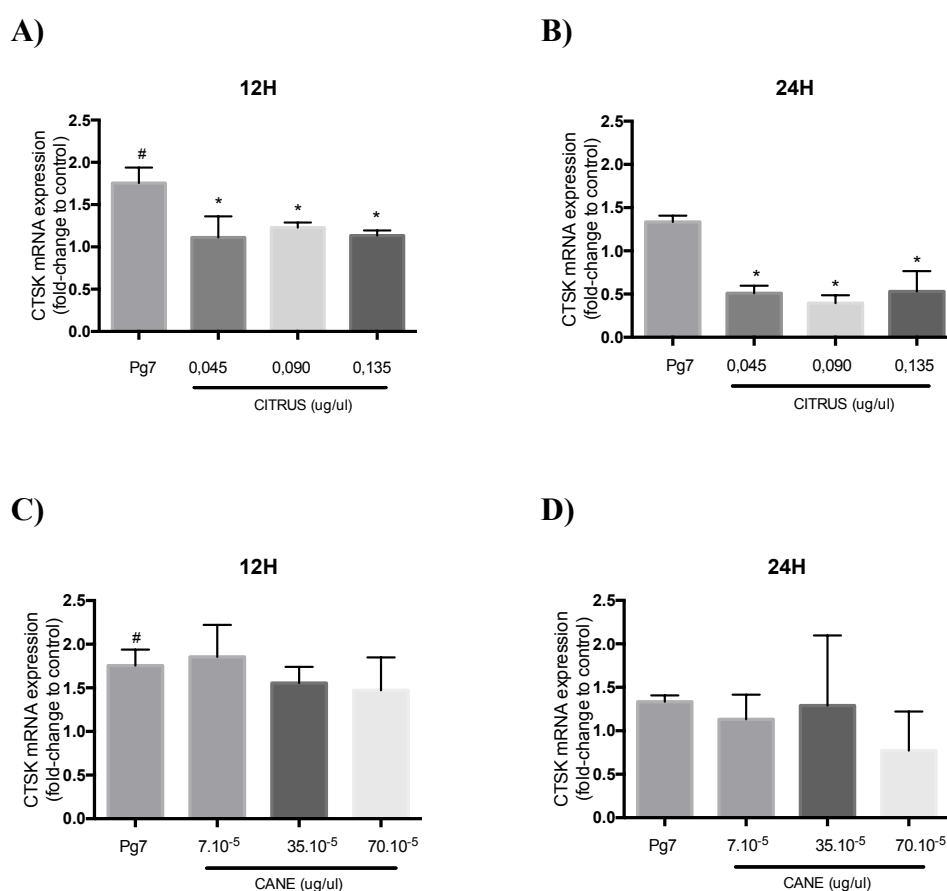


Avaliação da expressão gênica de Catepsinas K (A) e B (B) e TNF- α (C) pela técnica RT-PCR Tempo Real em fold-change em relação ao controle, nas células RAW 264.7 após 6, 12 e 24 horas de estímulo com LPS de *E. coli* (100µg/kg) e bactéria *P. gingivalis* inativada por calor (10^7 e 10^8 UFC/ml). Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): #em relação ao controle; *em relação ao LPS de *E.coli*. (n=6)

Fonte: Elaboração própria

B) Avaliação da atividade inibitória das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus CPI-2 na expressão gênica da Catepsina K, B e citocinas pró-inflamatórias nas células RAW 264.7, após 12 e 24 h de estímulo por Pg 10^7 UFC/ml inativada por calor, avaliado por RT-PCR em tempo real. Para a expressão de Catepsina K, os resultados demonstram um efeito inibitório da Citrus CPI-2 em suas 3 concentrações nos tempos 12 e 24 horas, sem diferença estatística entre elas. Já a Cane CPI-4 não demonstra uma inibição significativa em relação ao controle, porém sugere um aumento na expressão da Catepsina K principalmente no período de 12 horas (Figura 4).

Figura 4 - Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica da Catepsina K

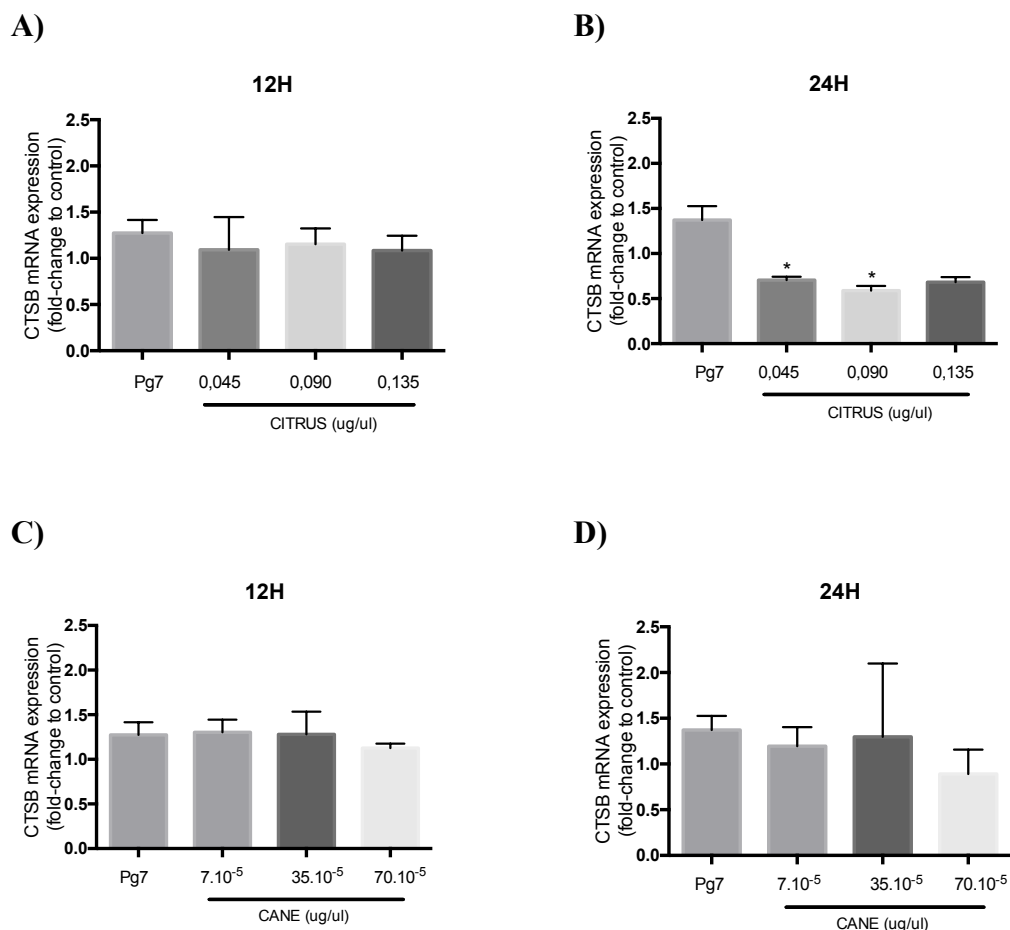


Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica (RT-PCR em tempo real em fold-change em relação ao controle) da Catepsina K nas células RAW 264.7. A) Efeito inibitório da Citrus após 12 h de estímulo por Pg 10^7 UFC/ml inativada por calor. B) Efeito inibitório da Citrus após 24 h de estímulo. C) Efeito inibitório da Cane após 12 h de estímulo. D) Efeito inibitório da Cane após 24 h de estímulo. Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): # em relação ao controle; * em relação ao Pg 10^7 . (n=6)

Fonte: Elaboração própria

Para a expressão de Catepsina B, os resultados demonstram um efeito inibitório apenas da Citrus CPI-2 nas concentrações de 0,045 ug/ul e 0,090 ug/ul, no período de 24 horas. Todos os demais tratamentos não demonstraram efeito inibitório sobre esta catepsina. A Cane CPI-4 apresentou em alguns casos aumento na expressão gênica da Catepsina B nos tempos 12 e 24 horas (Figura 5).

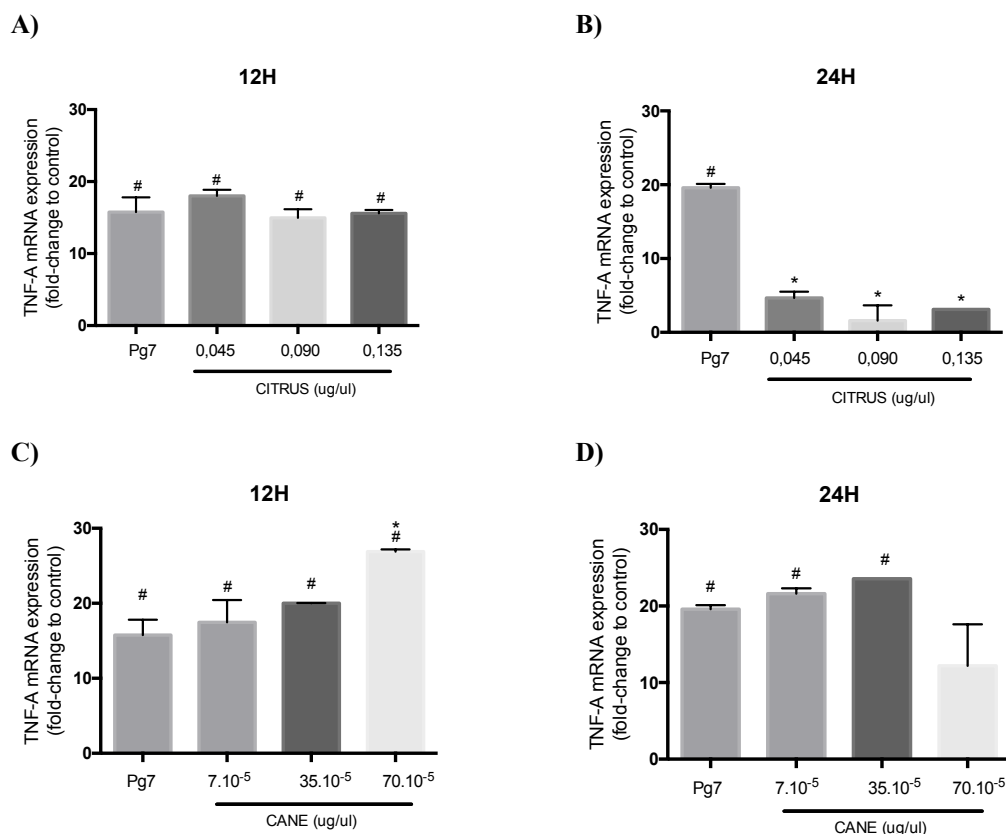
Figura 5 - Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica da Catepsina B



Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica (RT-PCR em tempo real em fold-change em relação ao controle) da Catepsina B nas células RAW 264.7. A) Efeito inibitório da Citrus após 12 h de estímulo por Pg 10^7 UFC/ml inativada por calor. B) Efeito inibitório da Citrus após 24 h de estímulo. C) Efeito inibitório da Cane após 12 h de estímulo. D) Efeito inibitório da Cane após 24 h de estímulo. Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): *em relação ao Pg 10^7 . (n=6)
Fonte: Elaboração própria

Para expressão do TNF- α os resultados demonstram um efeito inibitório da Citrus CPI-2 nas 3 concentrações (0,045 ug/ul; 0,090 ug/ul; 0,135 ug/ul) apenas no período de 24 horas. A Cane CPI-4 novamente não demonstra uma inibição de TNF- α , mas ao contrário, apresenta um aumento na expressão gênica em ambos os períodos (Figura 6).

Figura 6 - Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica de TNF- α

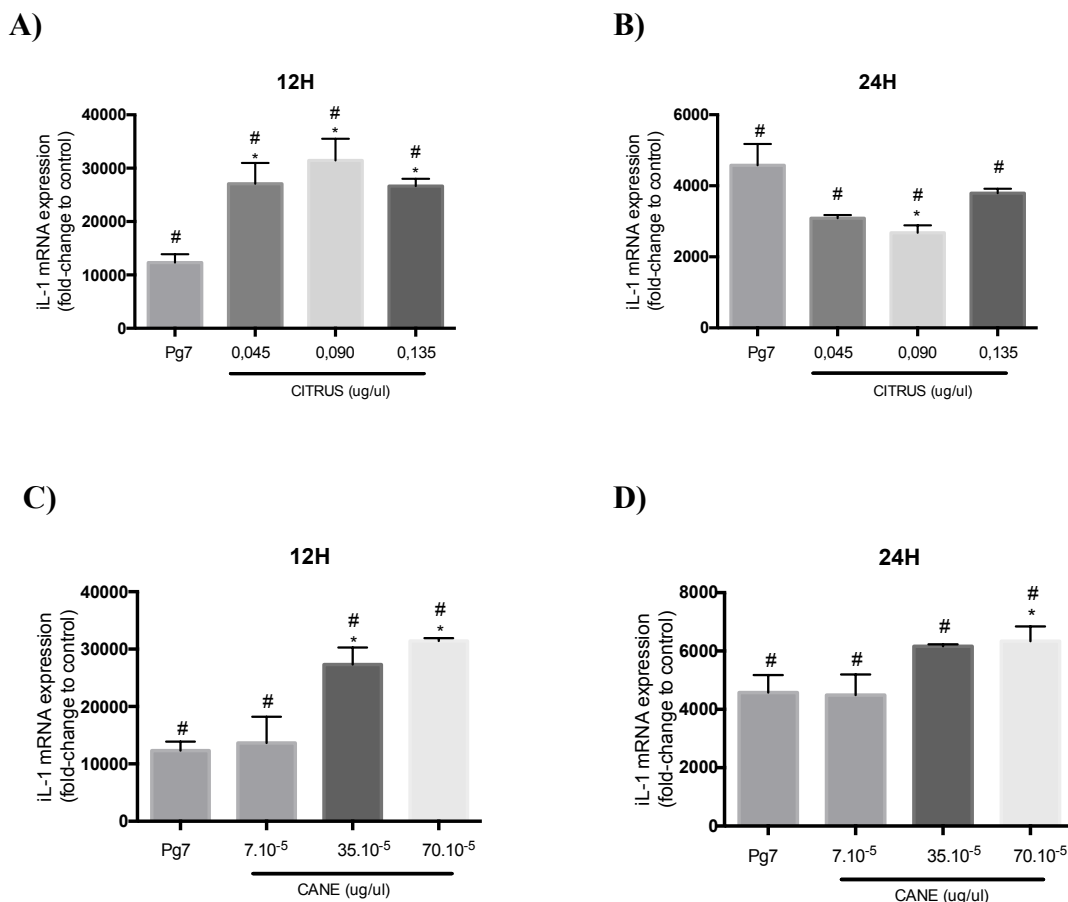


Efeito inibitório das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus CPI-2 na expressão gênica (RT-PCR em tempo real em fold-change em relação ao controle) de TNF- α nas células RAW 264.7. A) Efeito inibitório da Citrus após 12 h de estímulo por Pg 10⁻⁷ UFC/ml inativada por calor. B) Efeito inibitório da Citrus após 24 h de estímulo. C) Efeito inibitório da Cane após 12 h de estímulo. D) Efeito inibitório da Cane após 24 h de estímulo. Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): # em relação ao controle; *em relação ao Pg10⁻⁷. (n=6)

Fonte: Elaboração própria

Já para a citocina IL-1 β , os resultados demonstram um estímulo significativo na expressão desta citocina no período de 12h, induzido tanto pela Citrus CPI-2 quanto pela Cane CPI-4. No período de 24h, observa-se uma inibição significativa induzida pela Citrus CPI-2 0,090 ug/ul, enquanto que a Cane CPI-4 mantém o estímulo positivo na expressão da citocina (Figura 7).

Figura 7 - Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica de IL-1 β

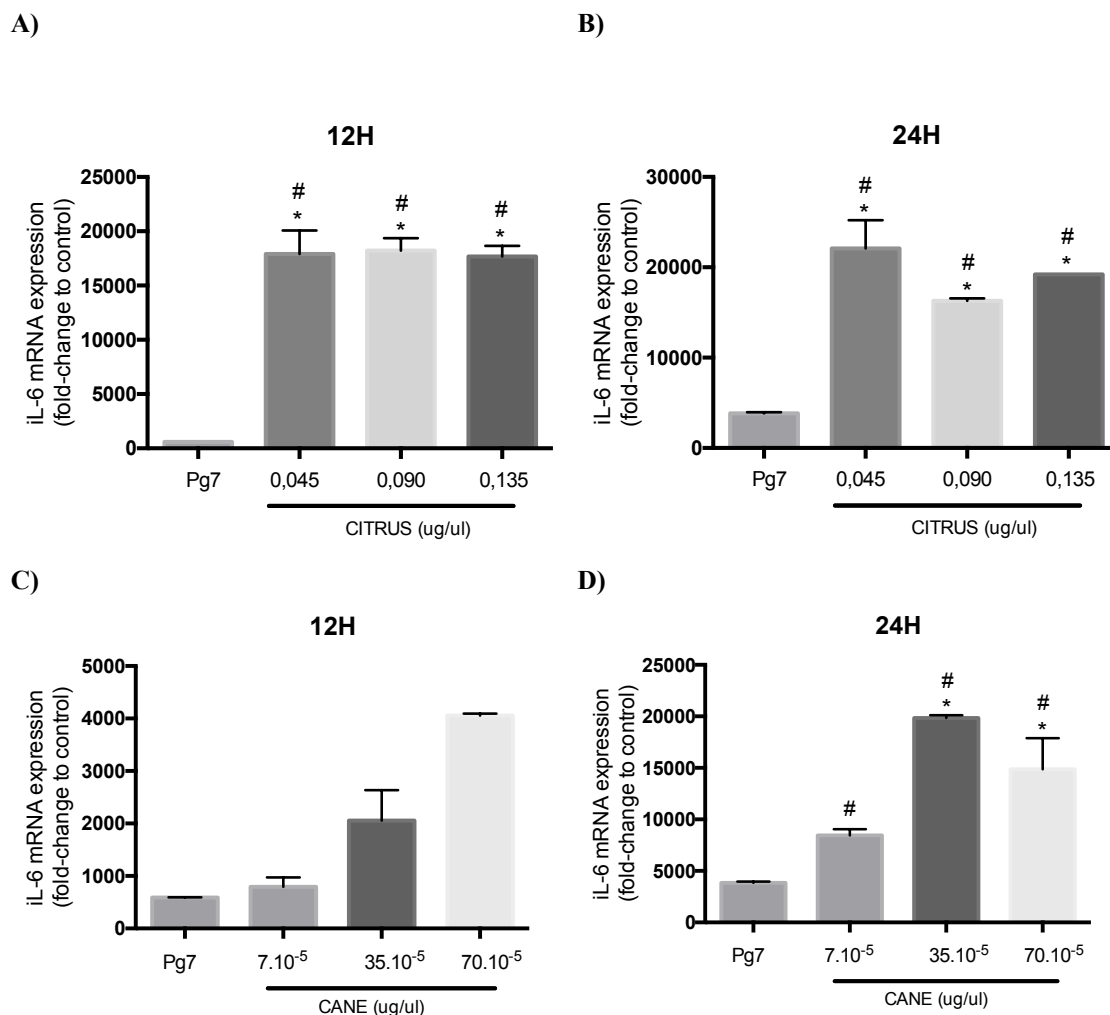


Efeito inibitório das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus CPI-2 na expressão gênica (RT-PCR em tempo real em fold-change em relação ao controle) de IL-1 β nas células RAW 264.7. A) Efeito inibitório da Citrus após 12 h de estímulo por Pg 10⁷ UFC/ml inativada por calor. B) Efeito inibitório da Citrus após 24 h de estímulo. C) Efeito inibitório da Cane após 12 h de estímulo. D) Efeito inibitório da Cane após 24 h de estímulo. Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): # em relação ao controle; * em relação ao Pg10⁷. (n=6)

Fonte: Elaboração própria

Para a citocina IL-6 os resultados demonstram um estímulo significativo na expressão desta citocina em ambos períodos, induzido tanto pela Citrus CPI-2 quanto pela Cane CPI-4 (Figura 8).

Figura 8 - Efeito inibitório das fitocistatinas na expressão gênica de IL-6



Efeito inibitório das fitocistatinas Cane CPI-4 e Citrus CPI-2 na expressão gênica (RT-PCR em tempo real em fold-change em relação ao controle) de IL-6 nas células RAW 264.7. A) Efeito inibitório da Citrus após 12 h de estímulo por $Pg 10^7$ UFC/ml inativada por calor. B) Efeito inibitório da Citrus após 24 h de estímulo. C) Efeito inibitório da Cane após 12 h de estímulo. D) Efeito inibitório da Cane após 24 h de estímulo. Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): # em relação ao controle; *em relação ao $Pg10^7$. (n=6)

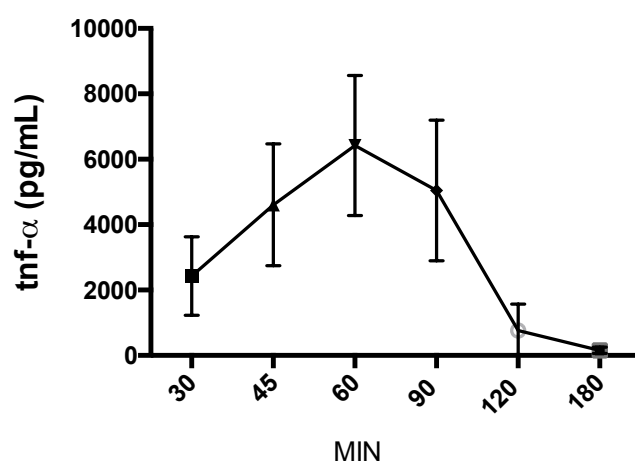
Fonte: Elaboração própria

5.2 Estudo In Vivo

5.2.1 Produção da citocina pró-inflamatória TNF- α

Neste experimento foi analisada a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α por células sanguíneas de ratos, através do Teste de Elisa, em diferentes tempos (30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos) após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg) administrado IV. Os resultados demonstram o aumento da expressão de TNF- α no tempo 45, chegando ao pico de concentração no tempo de 60 minutos (Figura 9).

Figura 9 - Produção de TNF- α



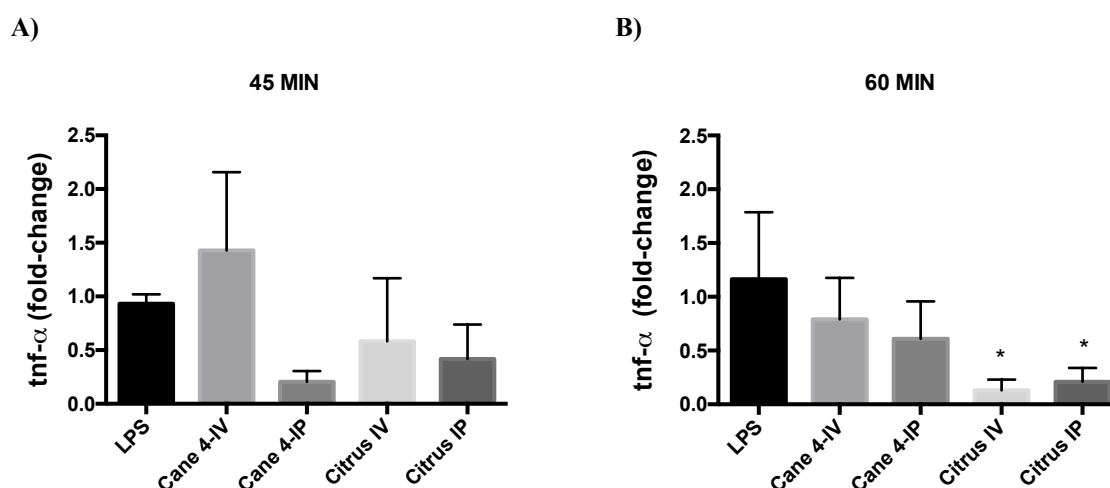
Produção da citocina pro-inflamatória TNF- α por células sanguíneas de ratos (Teste de Elisa) após estímulo com LPS de *E. coli* (100 μ g/kg) administrado IV, ao longo do tempo.

Fonte: Elaboração própria

5.2.2 Primeira etapa experimental

Avaliação da ação inibitória das fitocistatinas Cane CPI-4 (5 mg/kg) e Citrus CPI-2 (0,82 mg/kg) administradas IV e IP na produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos, 45 e 60 minutos após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg). No período de 45 minutos os resultados demonstram uma tendência à redução da produção de TNF- α tanto pela Citrus CPI-2 administrada IV e IP quanto pela Cane CPI-4 administrada IP, porém sem diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). No período de 60 minutos, todos os grupos demonstraram uma redução na produção da citocina, porém os grupos da Citrus CPI-2 administrada IP e IV demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo LPS ($p < 0,05$) (Figura 10).

Figura 10 - Primeira etapa experimental: Ação inibitória das fitocistatinas na produção de TNF- α



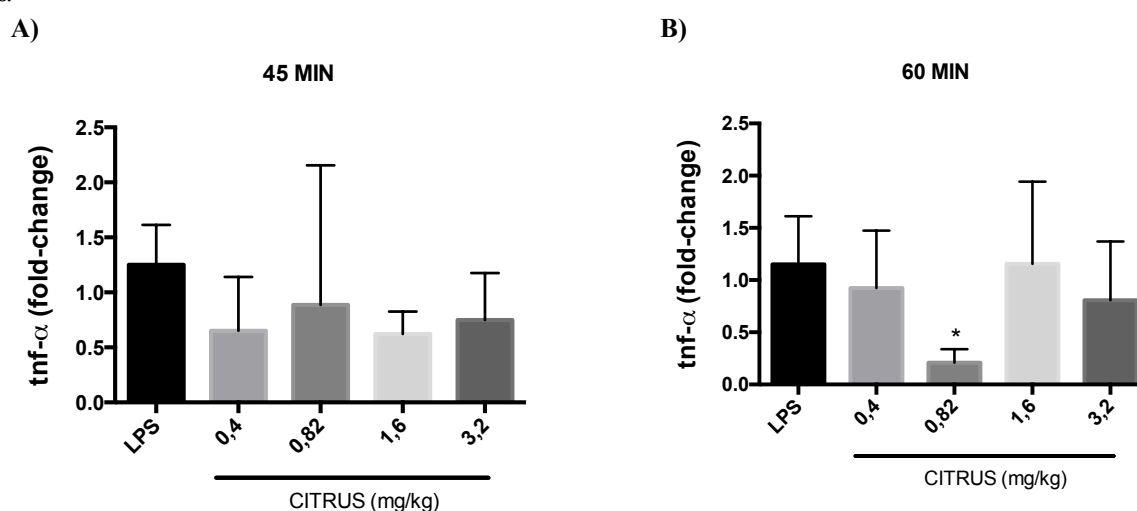
Ação inibitória das fitocistatinas Cane CPI-4 (5 mg/kg) e Citrus CPI-2 (0,82 mg/kg) administradas IV ou IP, na produção de TNF- α do plasma sanguíneo de ratos (Teste de Elisa em fold- change em relação ao LPS). A) Período de 45 minutos após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg). B) Período de 60 minutos após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg) * Diferença significativa em relação ao LPS de *E. coli*. (n=5)

Fonte: Elaboração própria

5.2.3 Segunda etapa experimental

Avaliação da ação inibitória da fitocistatina Citrus CPI-2 em diferentes concentrações (0,4 mg/kg; 0,82 mg/kg; 1,6 mg/kg; 3,2 mg/kg) administradas IP na produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos, nos períodos 45 e 60 minutos após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg). No período de 45 minutos, os resultados demonstram uma redução da produção de TNF- α em todos os grupos, porém não demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No período de 60 minutos, todos os grupos demonstram uma redução na produção, porém o grupo com a concentração de 0,82 mg/kg demonstrou uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 11).

Figura 11 - Segunda etapa experimental: Ação inibitória das fitocistatinas na produção de TNF- α



Ação inibitória da Citrus CPI-2 administrada IP, nas concentrações de 0,4 mg/kg, 0,82 mg/kg, 1,6 mg/kg, 3,2 mg/kg na produção de TNF- α por células sanguíneas de ratos (Teste de Elisa em *fold-change em relação ao LPS*). A) Período de 45 minutos após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg). B) Período de 60 minutos após estímulo com LPS de *E.coli* (100 μ g/kg)

* Diferença significativa em relação ao LPS de *E. coli*. (n=5)

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado e executado para avaliar o efeito inibitório de duas fitocistatinas (Cane CPI-4 e Citrus CPI-2) sobre mediadores inflamatórios. Os resultados no estudo *in vitro* indicam a efetiva inibição da fitocistatina Citrus CPI-2 sobre a catepsina K, B e citocinas TNF- α e IL-1 em macrófagos de camundongos e no estudo *in vivo* demonstram a ação inibitória da Citrus CPI-2 na produção do TNF- α por células sanguíneas de ratos. Ambos os estudos realizados são os primeiros a avaliar o efeito anti-inflamatório das fitocistatinas produzidas em cana-de-açúcar e laranja em células do sistema imune *in vitro* e *in vivo*, na corrente circulatória de ratos. Estes estudos procuraram, ainda que de forma indireta, avaliar a possibilidade de uso terapêutico das fitocistatinas, porém apenas a cistatina derivada da laranja apresentou resultados consistentes e promissores até o momento.

A fitocistatina Citrus CPI-2, derivada da laranja, é um novo candidato a fármaco desenvolvido ainda sem estudos publicados. Esta foi desenvolvida alguns anos após a obtenção da Cane CPI-4, derivada da cana-de-açúcar, cujos estudos de caracterização e determinação de propriedades biológicas estão mais avançados⁴⁷. A fitocistatina Cane CPI-4 tem estudos *in vitro* e *in vivo*^{16,38,45,51} demonstrando que esta cistatina tem efeito inibitório sobre as cisteíno proteinases, e tem um papel importante em muitos processos fisiológicos.

No presente estudo *in vitro* foi observado uma inibição na expressão gênica de Catepsinas K, tanto em 12 como 24 horas nas 3 diferentes concentrações de Citrus CPI-2 utilizadas. Estes resultados não foram obtidos com a Cane CPI-4. Porém, um estudo anterior, demonstrou a ação inibitória da Cane CPI-1 sobre as catepsinas K, L e V. Este foi o primeiro estudo que demonstrou atividade inibitória da Canacistatina sobre as cisteíno peptidases.

Estudos indicam que a catepsina K se encontra no fluido crevicular de pacientes com doença periodontal³⁷ e tem um papel importante na atividade dos osteoclastos¹³. Em um estudo em camundongos a deleção da catepsina K mostrou uma redução da inflamação e da erosão óssea dentro das cápsulas articulares da Artrite Reumatóide e das lesões periodontais²¹. Sendo assim, fármacos que tenham ação inibitória sobre a catepsina K podem ter efeito terapêutico para diversas doenças²¹.

Quanto à catepsina B, no presente estudo *in vitro* a Citrus CPI-2 demonstrou uma inibição da expressão gênica depois de 24 horas de ação nas concentrações 0,045 e 0,090

ug/ul. A Cane CPI-4 também não apresentou uma ação inibitória significativa sobre a molécula. Alguns estudos demonstram a ação da canacistatina na inibição da catepsina B, e da catepsina L em células cancerígenas mamárias¹⁶⁻⁴⁵. No estudo do Gianotti¹⁶ 2008, a atividade inibitória das cistatinas sobre a catepsinas humanas B e L foram avaliadas com um ensaio de fluorometria. A catepsina L foi inibida por três tipos de cistatinas; Cane CPI-2, Cane CPI-3 e Cane CPI-4 e a catepsina B só foi inibida pela Cane CPI-4, empregada neste estudo.

A expressão gênica das citocinas IL-1 e TNF- α foi inibida pela fitocistatina Citrus CPI-2 após 24 horas do estímulo inflamatório, porém a Cane CPI-4 não apresentou uma ação inibitória nessas moléculas. Como comentado acima, não existem dados publicados até o momento sobre a ação da Citrus CPI-2 e da Cane CPI-4 sobre as citocinas pró-inflamatórias. Como essas moléculas estão envolvidas nos processos inflamatórios, suas ações são reguladas por um grande numero de proteínas inibidoras endógenas. As citocinas avaliadas neste estudo apresentam alta expressão e produção nos tecidos envolvidos em diversas doenças crônicas inflamatórias, como as doenças periodontais e a artrite reumatóide³⁻⁴⁴. Nestas doenças, as citocinas participam da diferenciação de osteoclastos, resultando na destruição óssea, nos maxilares e articulações, respectivamente³. Portanto, fármacos que inibam a expressão destas moléculas são promissoras para a inibição das doenças citadas. Neste sentido, novos estudos pré-clínicos com o desenvolvimento experimental da doença periodontal e da artrite reumatóide devem ser propostos para se avaliar possíveis efeitos terapêuticos da fitocistatina Citrus CPI-2.

Em um estudo prévio, tanto TNF- α quanto IL-1 estimulam o aumento da atividade de cisteíno proteinases de células de fibroblastos sinoviais de pacientes com Artrite Reumatoide e Osteoartrite²³. Outro estudo demonstrou que as citocinas TNF- α , Factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), Interferão gama (IFN-g) induzem uma secreção seletiva de catepsinas B e L em células de fibroblastos sinoviais de pacientes com Artrite Reumatóide. Este efeito seletivo das citocinas na secreção de cisteíno proteinases sugere que a degradação articular mediada por células fibroblásticas sinoviais é um processo altamente regulado, e que estas citocinas estão envolvidas no processo da produção e liberação das cisteíno proteinases³¹.

No presente estudo in vivo, o modelo de indução de produção e liberação de TNF- α induzida por LPS de E.coli utilizado já está estabelecido na literatura e os resultados

observados no presente estudo comprovam que a indução do TNF- α foi efetivamente alcançada⁵⁷. Porém, variações na concentração de TNF- α no plasma sanguíneo, podem ser observadas, já que a síntese ou liberação da mesma depende de cada animal durante a resposta ao desafio de LPS. Em nosso estudo observamos um desvio padrão alto entre os animais do grupo LPS, conforme observado na Figura 9. No entanto, vale ressaltar que os ratos fornecem uma quantidade de volume de sangue por animal que é suficiente para a avaliação de TNF- α no plasma sanguíneo para diferentes tempos, gerando menos interferência nos dados de variações entre estes animais, quando comparados a camundongos¹⁸.

No presente estudo foi observado um significativo aumento da produção de TNF- α no plasma sanguíneo após a injeção com LPS IV, no tempo de 45 minutos e o pico máximo em 60 minutos no grupo que foi estimulado com LPS, sendo os valores de TNF- α em plasma entre 7 e 8 ng/ml. Resultados similares foram observados no estudo de Wang et al.⁵⁷ 2006, onde a produção de TNF- α começou a aumentar no minuto 30 e chegou a sua máxima produção no minuto 90, sofrendo rápida queda 3 a 4 horas após a administração do LPS, sendo os valores de TNF- α em plasma entre 8 e 10 ng/ml.

Quanto à inibição na produção de TNF- α promovida pelas fitocistatinas, observamos que a Citrus CPI-2 na concentração de 0,82 mg/kg administrada IP mostrou melhor eficácia no tempo de 60 minutos após a injeção com LPS de *E.coli*. Já a Cane CPI-4 não apresentou uma inibição significativa.

Utilizamos 4 diferentes concentrações de fitocistatina Citrus CPI-2 (0,4 mg/kg; 0,82 mg/kg; 1,6 mg/kg; 3,2 mg/kg) administradas IP. Como se mencionou anteriormente, a concentração de 0,82 mg/kg demonstrou uma maior ação inibitória. Os resultados sugerem que uma concentração menor não é suficiente para inibir a citocina e as concentrações maiores produzem outro tipo de ação no organismo. Portanto, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica das fitocistatinas são indicados, para que se tenha certeza quais são as vias e as moléculas que estão envolvidas na ação das fitocistatinas, assim como o tempo de ação. Desta forma será possível determinar a concentração e via de administração adequada para realizar um tratamento efetivo, com aproveitamento adequado do fármaco.

Um estudo piloto foi feito por nosso grupo de trabalho para avaliar a ação inibitória das fitocistatinas na doença periodontal induzidas em camundongos. Os resultados avaliados com microtomografia computadorizada (micro CT) demonstraram

uma diminuição da perda óssea no grupo de animais tratado com a Citrus CPI-2. Estes resultados preliminares indicam que esta fitocistatina tem um efeito benéfico contra a destruição do tecido ósseo na doença periodontal. Porém, novos estudos *in vivo* estão sendo desenvolvidos para se confirmar estes resultados.

Nossos resultados demonstraram que a Citrus CPI-2 tem um efeito inibitório em catepsinas e citocinas pró-inflamatórias, isto pode levar a novas terapias para o controle de doenças inflamatórias como a doença periodontal. Em relação à fitocistatina Cane CPI-4 que não apresentou o efeito inibitório esperado, novos estudos devem ser realizados variando a concentração e/ou via de administração. Também realizar estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, vão permitir que se determine com precisão a concentração do fármaco necessário para realizar o efeito desejado em um período de tempo definido.

7 CONCLUSÃO

Segundo as hipóteses propostas para este estudo, os dados obtidos no estudo *in vitro* demonstram que a fitocistatina Citrus CPI-2 mostrou-se eficaz na inibição da expressão gênica das moléculas testadas (Catepsina K, Catepsina B, TNF- α e IL-1), a Cane CPI-4 não apresentou uma redução da expressão dos genes avaliados em células macrofágicas de linhagem celular de camundongos, RAW 264.7 após os períodos de estímulo inflamatório.

No estudo *in vivo* a Citrus CPI-2(0,8 mg/kg) administrada via IP e IV mostrou melhor eficácia na inibição da produção de TNF- α por células do plasma sanguíneo em ratos, estimuladas por LPS, enquanto a Cane CPI-4 não apresentou uma inibição significativa.

Sendo assim, os dados obtidos sugerem que a fitocistatina Citrus CPI-2 possui potencial para ser utilizada na modulação da resposta do hospedeiro como terapia auxiliar no tratamento da doença periodontal. Portanto, estudos adicionais são justificados para se comprovar esta aplicação.

REFERÊNCIAS*

1. Abrahamson M. Cystatins – Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *J Braz Assoc Advanc Science*. 1993; 45: 229-304.
2. Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes*. 2nd.ed. San Diego: Elsevier; 2004.
3. Beck G, Bottomley G, Bradshaw D, Brewster M, Broadhurst M, Devos R, et al. (E)-2(R)-[1(S)-(Hydroxycarbamoyl)-4-phenyl-3-butenyl]-2 - isobutyl-2 - (methanesulfonyl)-4-methylvalerohydrazide (Ro 32-7315), a selective and orally active inhibitor of tumor necrosis factor- α convertase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302(1): 390-6.
4. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007; 86(6): 529-33.
5. Chen HY, Cox SW, Eley BM. Cathepsin B,2-macroglobulin and cystatin levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(1): 34-41.
6. Conway J, Andrews R, Beaudet B, Bickett D, Boncek V, Brodie T, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α (tnf- α) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of tnf- α -converting enzyme and matrix Metalloproteinases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298(3): 900-8.
7. Cox SW, Eley BM. Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV- like activities in gingival crevicular fluid: a comparison of levels before and after basic periodontal treatment of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(5): 333-9.
8. Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(3): 238-75.
9. Eley BM, Cox SW. Cathepsin B/ L, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV- like activities in gingival crevicular fluid: Correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodont Res*. 1992; 27(1): 62-9.
10. Eley BM, Cox SW. The relationship between gingival crevicular fluid cathepsin B activity and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients: a 2-year longitudinal study. *J Periodont Res*. 1996; 31(6): 381-92.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

- 11.Fuller K, Lawrence KM, Ross JL, Grabowska UB, Shiroom, Samuelsson B, et al. Cathepsin K inhibitors prevent matrix-derived growth factor degradation by human osteoclasts. *Bone*. 2008; 42(1): 200-11.
- 12.Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000; 71(10): 1535-45.
- 13.Garg G, Pradeep A, Thorat M. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(11): 997-1074.
- 14.Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*. 1993; 64(10): 980-3.
- 15.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.
- 16.Gianotti A, Sommer C, Carmona A, Henrique-Silva F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L human breast cancer cell invasion. *Biol Chem*. 2008; 389(4): 447-53.
- 17.Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(12): 1046-52.
- 18.Gozzi, P, Pahlman I, Palmer, L, Gronberg A, Persson S. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the immunomodulating agent susalimod and experimentally induced tumor necrosis factor-alpha levels in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 291(1): 199-203.
- 19.Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003; 74(3): 391-401.
- 20.Hannaford J, Guo H, Chen X. Involvement of cathepsins B and L in inflammation and cholesterol trafficking protein NPC2 secretion in macrophages. *Obesity*. 2013; 21(8): 1586-95.
- 21.Hao L, Zhu G, Lu Y, Wang M, Jules J, Zhou X, et al. Deficiency of cathepsin K prevents inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis and periodontitis and reveals its shared osteoimmune role. *FEBS Lett*. 2015; 589(12): 1331-9.
- 22.Hou WS, Brömme D, Zhao Y, Mehler E, Dushey C, Weinstein H, et al. Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J Clin Invest*. 1999; 103(5): 731-8.

23. Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M, et al. Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor- α and interleukin-1. *Arthr Rheum*. 1993; 36(6): 772–80.
24. Ichimaru E, Imura K, Hara Y, Kato Y, Kato I. Cystatin activity in gingival crevicular fluid from periodontal disease patients measured by a new quantitative analysis method. *J Periodont Res*. 1992; 27(2): 119-25.
25. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem*. 1997; 272(2): 1197-202.
26. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Comparative histochemical, biochemical and immunocytochemical studies of cathepsin B in human gingival tissue. *J Periodont Res*. 1994; 29(3): 203–13.
27. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Localization of active and inactive elastase, α -1-proteinase inhibitor, and α -2-macroglobulin in human gingiva. *J Dent Res*. 1995; 74(2): 667-74.
28. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Ultrastructural localisation of cathepsin B in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Histochem J*. 1997; 29(10): 727–34.
29. Krajewski AC, Biessei J, Kunze M, Maersch S, Perabo L, Noack MJ. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS*. 2009; 117(10): 746-54.
30. Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, et al. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol*. 2008; 79(1): 166-73.
31. Lemarie G, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, et al. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol*. 1997; 36(7): 735-43.
32. Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, et al. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 1997; 57(23): 5386-90.
33. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(6): 57-71.
34. Margis R, Reis EM, Villeret V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 359(1): 24-30.
35. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005; 15(11): 599-607.
36. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 α and -1 β in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1990; 25(3): 156-63.

37. Mogi M, Otogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(9): 894-8.
38. Motobu M, Amer S, Koyama Y, Hikosaka K, Sameshima T, Yamada M, et al. Protective effects of sugar cane extract on endotoxic shock in mice. *Phytother Res.* 2006; 20(5): 359-63.
39. Musil D, Zucic D, Engh RA, Mayr I, Huber R, Popovic T et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 1991; 10(9): 2321-30.
40. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldini S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res.* 2011; 90(4): 506-11.
41. Neervannan S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(5): 715-31.
42. Novinec M, Lenarcic B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *J Biol Chem.* 2013; 394(9): 1163-79.
43. Nycander M, Estrada S, Mort JS, Abrahamson M, Blork I. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Lett.* 1998; 422(1): 61-4.
44. Okada H, Murakami S. Cytokine express in eeriodontal eealth and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(3): 248-66.
45. 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): 1082-6.
46. Rawlings ND, Barrett AJ. Families of cysteine proteases. *Methods Enzymol.* 1994; 244: 461-86.
47. Reis EM, Margis R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analyses. *Gen Mol Biol.* 2001; 24(1-4): 291-6.
48. Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 1997; 76(12): 1833-9.
49. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1999; 287(1): 103-15.
50. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(3): 206-14.

51. 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.
52. Tezuka K, Tekuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, et al. Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem.* 1994; 269(2): 1106-9.
53. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 1991; 285(2): 213-9.
54. Turner P, Brabb T, Pekow C, Vasbinder M. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011; 50(5): 600–13.
55. Valeeva TA, Mosolov VV. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry.* 2004; 69(11): 1305-9.
56. 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.
57. Wang Q, Zhang Y, Hall J, Lin L, Raut U, Mollova N, et al. A rat pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 56(1): 67-71.
58. Yucel O, Berker E, Mesci L, Eratalay K, Tepe E, Tezcan I. Analysis of TNF- α (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF- α levels in aggressive and chronic periodontitis: a preliminary report. *Cytokine.* 2015; 72(2): 173–7.
59. Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1 β , prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(4): 285-93.

ANEXO A

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 43/2015

Interessada: NATALIA DA PONTE LEGUIZAMON

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

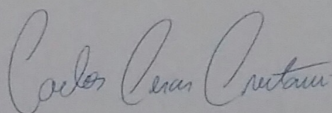
Projeto: Avaliação da atividade inibitória de fitocistatinas sobre mediadores inflamatórios na Doença Periodontal Experimental

Parecer nº 69/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (campus Araraquara), reunida em 12 de agosto de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Avaliação da atividade inibitória de fitocistatinas sobre mediadores inflamatórios na Doença Periodontal Experimental”, apresentado pela pós-graduanda NATALIA DA PONTE LEGUIZAMON, sob orientação do Professor Doutor Joni Augusto Cirelli, do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia – UNESP-Araraquara, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2017 em formulário para este fim.

Araraquara, 17 de agosto de 2015.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de fevereiro de 2017.

NATALIA DA PONTE LEGUIZAMÓN