

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/03/2024.



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



Sâmmea Martins Vieira

Efeito de tanshinonas sobre a perda óssea em periodontite apical induzida em camundongos

Araraquara

2022



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



Sâmmea Martins Vieira

Efeito de tanshinonas sobre a perda óssea em periodontite apical induzida em camundongos

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

Orientador: Gisele Faria

Araraquara

2022

V658e Vieira, Sâmmea Martins
Efeito de tanshinonas sobre a perda óssea em periodontite apical
induzida em camundongos / Sâmmea Martins Vieira. -- Araraquara,
2022
50 p. : il., tabs.

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

1. Camundongo. 2. Periodontite periapical. 3. Reabsorção óssea. 4.
Salvia miltiorrhiza. 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.

Sâmmea Martins Vieira

Efeito de tanshinonas sobre a perda óssea em periodontite apical induzida em camundongos

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Gisele Faria

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

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri

Araraquara, 25 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Sâmmea Martins Vieira

- NASCIMENTO:** 04 de março de 1995 – Oeiras – Piauí
- FILIAÇÃO:** Raimundo Sérgio de Lima Vieira
Laurinete Martins Vieira
- 2013 - 2018:** Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade Integral Diferencial – FACID, Teresina-PI
- 2020 - 2022:** Mestrado em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
- 2021 - Atual:** Especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB – USP)

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus, minha força, alegria e razão do meu viver.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pois sem Ele eu não teria chegado aonde cheguei. Obrigada por me acalmar nos momentos mais difíceis e por me fazer forte nos momentos que eu não acreditava em mim.

Aos meus amados pais, **Raimundo Sérgio de Lima Vieira** e **Laurinete Martins Vieira**, por sempre acreditarem e investirem no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por não medirem esforços para me manter feliz e alcançar os meus sonhos. Minha jornada acadêmica não seria nada sem vocês. Tudo o que eu tenho e o que eu sou, devo a educação, respeito, amor e carinho que vocês me ofereceram. Meus amados pais, vocês sempre serão meu número um em admiração e meu desejo é chegar a ser um pouco dos seres humanos que vocês são.

Aos meus queridos irmãos, **Salatiel Martins Vieira** e **Samy Martins Vieira**, por sempre me apoiarem e por cuidarem de mim. Mesmo de longe, vocês me ensinam a cada dia ter a motivação em lutar pelo o que eu desejo e por querer ser a minha melhor versão. Obrigada por serem o meu porto seguro.

A **Angelo Constantino Camilli**, meu porto seguro, meu melhor amigo e amor da minha vida. Obrigada por compartilhar de todos os momentos da minha vida. Agradeço por sempre estar disposto a me ouvir e me ajudar. Sem você nada disso seria possível. Agradeço por me animar nos momentos tristes e por acreditar em mim. Estamos construindo a nossa vida juntos e sei que o futuro reserva grandes coisas para nós dois. Você é mais do que eu poderia pedir. Te amo muito.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Gisele Faria**, por ter me aceitado e oferecido a oportunidade de realizar um grande sonho em prosseguir na carreira acadêmica. Obrigada por acreditar no meu potencial como pesquisadora e me oferecer os instrumentos para trilhar em um caminho de crescimento profissional. Tenho grande admiração pela sua dedicação ao ensino, competência, responsabilidade e profissionalismo na pesquisa e agradeço por ter me ensinado a construir uma versão de mim, seguindo esses princípios.

Aos **Professores Doutores Joni Augusto Cirelli e Paulo Sérgio Cerri**, por nos apoiar e compartilhar seus conhecimentos. Sou eternamente grata por toda a ajuda e incentivo.

Às alunas do Professor Joni Augusto Cirelli, **Angélica Pavanelli e Camila Marcantonio**, pela amizade, dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e alunos da Professora Gisele Faria, **Ana Flávia Balestrero, Hérrnan Coaguila Llerena e Victor Ochoa Rodriguez**, pela amizade, acolhimento e incentivo em cada projeto.

Aos meus amigos do **centro acadêmico de Odontologia** da Faculdade Integral Diferencial, por torcerem e festejarem pelas minhas conquistas.

À minha professora amada e querida, **Maria Cristina Freitas**. Não poderia deixar de citá-la, pois sem você eu não poderia ter chegado aonde estou. Lembro o quanto você me incentivou a prestar a prova do mestrado e o quanto ficou feliz em saber que eu tinha sido aprovada. Minha eterna gratidão.

Aos meus **colegas de mestrado**, obrigada por toda colaboração e motivação. Estamos juntos.

À funcionária do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Suleima Ferreira**, agradeço por todo cuidado, ajuda, amizade e também, disponibilidade.

Aos funcionários do setor de pós-graduação, **Cristiano Afonso Lamounier e José Alexandre Garcia** por toda atenção e educação em transmitir as informações.

Aos **professores da Disciplina de Endodontia** do Departamento de Odontologia Restauradora, pela formação e orientação.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP** por toda a estrutura proporcionada para a realização deste curso.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de mestrado - (Processo nº 132175/2020-7)

“A grande generosidade está em lutar para que, cada vez mais, estas mãos, sejam de homens ou de povos, se estendam menos, em gestos de súplica. Súplica de humildes a poderosos. E se vão fazendo, cada vez mais, mãos humanas, que trabalhem e transformem o mundo... Lutando pela restauração de sua humanidade estarão, sejam homens ou povos, tentando a restauração da generosidade verdadeira”. Paulo Freire*

*Freire P. Pedagogia do oprimido. 32.ed. Rio de Janeiro: Ed.Paz e Terra; 2002. P.31.

Vieira SM. Efeito de tanshinonas sobre a perda óssea em periodontite apical induzida em camundongos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A periodontite apical (PA) é causada pela infecção do sistema de canais radiculares. Ela se caracteriza pela presença de inflamação e destruição de tecidos mineralizados e não mineralizados periapicais, processos esses que envolvem a produção de citocinas pró-inflamatórias, osteoclastogênese e ação de enzimas, dentre elas a catepsina K (CatK). As tanshinonas são substâncias extraídas da planta medicinal chinesa *Salvia miltiorrhiza*. A tanshinona IIA (TIIA) inibe a osteoclastogênese / reabsorção óssea e promove a osteoblastogênese / formação óssea. A tanshinona IIA sulfonato de sódio (T06) inibe perda óssea via inibição da atividade colagenolítica da CatK, sendo que ambas tanshinonas apresentam atividade anti-inflamatória. Considerando os referidos efeitos, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de TIIA e T06 sobre a destruição óssea em PA induzida em camundongos. Foram utilizados 40 camundongos *wild-type* da linhagem C57BL/6, machos, com 8 semanas. Após abertura coronária, a polpa dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo de 30 animais foi removida/desorganizada, e a câmara pulpar foi deixada aberta ao ambiente bucal para contaminação e formação da lesão periapical por um período de 10 dias. Os camundongos foram distribuídos em 4 grupos (n=10/grupo): Grupo com indução de PA e tratamento com TIIA (40 mg/Kg/dia); Grupo com indução de PA e tratamento com T06 (40 mg/Kg/dia); Grupo com indução de PA e tratamento com veículo (água destilada); e Grupo sem indução da PA e sem intervenção terapêutica. As substâncias foram administradas por gavagem, uma vez ao dia, durante os 10 dias do experimento. Após eutanásia, uma hemi-mandíbula foi fixada em paraformaldeído e submetida ao exame em microtomógrafo para mensuração do volume do espaço periapical. O volume do espaço periapical (mm³) nos grupos que receberam indução da PA e tratamentos com TIIA e T06 foi maior que no grupo controle – sem indução de PA ($p < 0,0001$), denotando a formação da lesão periapical naqueles. Não houve diferença estatisticamente significativa no volume da lesão periapical entre os grupos que receberam tratamentos com TIIA, T06 e água ($p > 0,05$). Concluiu-se que as tanshinonas IIA e 06, administradas por 10 dias, não tiveram efeito na destruição óssea em periodontite apical induzida em camundongos.

Palavras – chave: Camundongo. Periodontite periapical. Reabsorção óssea. *Salvia miltiorrhiza*.

Vieira SM. Effect of tanshinones on bone loss in experimentally induced mice apical periodontitis [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Apical periodontitis (AP) is caused by infection of the root canal system. It is characterized by the presence of inflammation and destruction of periapical mineralized and non-mineralized tissues, processes that involves the production of pro-inflammatory cytokines, osteoclastogenesis and the action of enzymes, including cathepsin K (CatK). Tanshinones are substances extracted from the Chinese medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. Tanshinone IIA (TIIA) inhibits osteoclastogenesis / bone resorption and promotes osteoblastogenesis / bone formation. Tanshinone IIA sodium sulfonate (T06) inhibits bone loss via inhibition of the collagenolytic activity of CatK. Both tanshinones have anti-inflammatory activity. Considering these effects, the aim of the study was to evaluate the effect of TIIA and T06 on bone destruction in AP induced in mice. Fifty wild-type mice (C57BL/6), male, aged 8 weeks, were used. After coronal opening, the pulp of the lower first molars on the right and left sides of 30 animals was removed/disorganized, and the pulp chamber was left open to the oral environment for contamination and periapical lesion formation for a period of 10 days. The mice were distributed into 4 groups (n=10/group): Group with AP induction and treatment with TIIA (40 mg/Kg/day); Group with AP induction and treatment with T06 (40 mg/kg/day); Group with AP induction and treatment with vehicle (distilled water); and Group without AP induction and without therapeutic intervention. The substances were administered by gavage, once a day, during the 10 days of the experiment. After euthanasia, one hemi-mandible was fixed in paraformaldehyde and submitted to microtomography for periapical space volume measurement. The volume of periapical space (mm³) in the groups that received AP induction and treatments with TIIA, T06 and water was greater than in the control group – without AP induction ($p < 0.0001$), denoting the formation of the periapical lesion in those. There was no statistically significant difference in periapical lesion volume between groups that received treatments with TIIA, T06 and water ($p > 0.05$). It was concluded that tanshinones IIA and 06, administered for 10 days, had no effect on bone destruction in induced apical periodontitis in mice.

Keywords: Mice. Periapical periodontitis. Bone resorption. *Salvia miltiorrhiza*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 PUBLICAÇÃO	21
4 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	45
ANEXO.....	50

1 INTRODUÇÃO

Metade da população adulta mundial tem pelo menos um dente com periodontite apical¹. A periodontite apical é causada pela infecção do sistema de canais radiculares^{2,3} e se caracteriza pela presença de inflamação e destruição de tecidos mineralizados e não mineralizados perirradiculares, incluindo colágeno e outros componentes da matriz extracelular^{2,4}. Os micro-organismos e seus componentes antigênicos estimulam as células do infiltrado inflamatório, principalmente os macrófagos, a produzirem interleucina (IL) - 1, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-6, que são considerados mediadores primários e principais reguladores da osteoclastogênese⁵⁻⁹. A via molecular de modulação da osteoclastogênese é composta pelo sistema receptor ativador do fator nuclear-kappaB - NF-κB - (RANK), seu ligante solúvel (RANKL) e pela osteoprotegerina (OPG). O RANKL é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), secretado por osteoblastos, células T e células B ao serem ativados por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF. O RANKL ativa a diferenciação em osteoclastos ao ligar-se ao RANK expresso na superfície celular de seus precursores. A OPG é um receptor solúvel que, ao se ligar ao RANKL, impede a sua ligação ao seu receptor RANK e inibe a diferenciação de osteoclastos^{10,11}. A solubilização do componente mineral inorgânico ocorre devido à produção e bombeamento de prótons pelos osteoclastos, que tornam o microambiente ácido¹². A degradação de componentes orgânicos do tecido mineralizado é realizada por enzimas líticas, dentre elas as metaloproteinasas da matriz (MMPs) e as cisteíno proteases, como a catepsina K – CatK^{4,13}, que atuam não apenas na degradação da matriz, como também na regulação do início dos processos de reabsorção¹⁴.

Para controlar a periodontite apical, é necessário regular a síntese dos mediadores inflamatórios^{13,15} e a atividade osteoclástica², o que é conseguido por meio controle de infecção proporcionado pelo tratamento endodôntico^{16,17}. Por outro lado, tem sido sugerido na literatura que inibidores de cisteíno proteases podem se constituir em uma nova classe de fármacos para serem utilizados no tratamento da periodontite apical^{18,19}.

As cisteíno proteases estão presentes em plantas, vírus, animais bactérias e protozoários²⁰, sendo divididas em 76 famílias²¹. Em humanos foram codificadas 11

cisteíno proteases (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W), conhecidas também como cisteína catépsinas ou catépsinas²². As cisteíno proteases estão envolvidas em processos fisiológicos como apoptose, remodelação tecidual, degradação de proteínas em diferentes situações²³⁻²⁶, e em processos patológicos como a osteoporose, metástase de tumores²⁷, artrite reumatoide²⁶, lesão de cárie²⁸, doença periodontal e periodontite apical^{13,18,29}.

A CatK, um tipo de cisteíno protease, é altamente expressa em osteoclastos¹⁸. Ela tem sido considerada um alvo promissor para o tratamento de determinadas doenças ósseas como a osteoporose, pois sua secreção na interface matriz-osteoclastos é considerada um evento chave na degradação óssea³⁰⁻³². A CatK é responsável por 98% da atividade de cisteíno proteases ósseas³³, exercendo um papel importante na degradação de uma série de proteínas, incluindo o colágeno tipo I³⁴⁻³⁶, com subsequente destruição tecidual³⁷⁻⁴⁰. Além disso, a CatK exerce papel na resposta imune; foi mostrado que a depleção gênica da CatK causou redução acentuada na inflamação e erosão/perda óssea nos quadros de artrite reumatóide e doença periodontal, por meio da diminuição de osteoclastos, macrófagos, células dendríticas e células T⁴¹.

Em relação à periodontite apical, estudos mostram que CatK está diretamente envolvida na reabsorção óssea que ocorre no desenvolvimento da lesão periapical^{13,18}. O silenciamento da expressão do gene da CatK, reduziu a destruição óssea e também a expressão de citocinas em lesões periapicais induzidas em dentes de ratos¹³. Foi demonstrado também que inibidores sintéticos de CatK (desenhados artificialmente), desenvolvidos para o tratamento de osteoporose pós-menopausa como o Odanacatib ou para artrite como o NC-2300, reduziram a expansão das lesões periapicais, o número de macrófagos, a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a função dos osteoclastos nas lesões induzidas em dentes de ratos. Considerando os efeitos protetores sobre a perda óssea e a inibição da inflamação, os autores desses estudos sugeriram que inibidores de CatK representam uma opção promissora de fármacos para o tratamento da periodontite apical^{18,19}, com possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias de tratamento dessa lesão¹⁸.

As cistatinas, principalmente as inibidoras da CatK, constituem uma classe de fármacos que são potentes antagonistas da atividade osteoclástica, reduzindo a perda óssea⁴², por exemplo, em casos de osteoporose³⁴. No entanto, apesar da seletiva inibição da CatK⁴³ e de não afetar o processo de formação óssea⁴⁴, nenhum desses

compostos, dentre eles o Odanacatib, foi aprovado devido aos efeitos adversos^{26,45}. Os efeitos adversos mais comuns são risco aumentado de acidente vascular cerebral (AVC), fibrilação atrial e esclerodermia fibrosante ou fibrose da pele^{26,46,47}. Esclerodermia fibrosante e fibrilação atrial são doenças relacionadas à fibrose^{48,49} e o AVC foi relacionado à fibrilação atrial⁵⁰. A fibrose por si só está fortemente ligada ao aumento da atividade de TGF- β 1 nesses tecidos⁵¹, e sabe-se que o uso do Odanacatib leva ao aumento das concentrações de TGF- β 1 em culturas de fibroblastos de pele ao prevenir a degradação de TGF β 1, a qual que é mediada por CatK⁵². Como tais medicamentos foram descritos como altamente seletivos para CatK, é provável que os efeitos adversos sejam atribuíveis à inibição direta de CatK em tecidos não esqueléticos/ósseos, uma vez que elas são enzimas multifuncionais envolvidas em várias vias metabólicas e regulatórias⁴⁵. Isso não significa que a CatK seja um alvo errado, mas que os medicamentos deveriam ser desenvolvidos para inibir somente a atividade colagenolítica da CatK, deixando suas outras funções preservadas⁴⁵.

Ainda em relação ao tratamento de doenças ósseas líticas, como a osteoporose, outras estratégias farmacológicas, que não a inibição de CatK, têm sido utilizadas. A característica comum da maioria dos antirreabsortivos é a supressão do número de osteoclastos. Antirreabsortivos, como o Denosumabe, reduzem diretamente o número de osteoclastos por interferir na osteoclastogênese por meio da neutralização do RANKL, enquanto os bisfosfonatos induzem a morte dos osteoclastos por apoptose⁵³. Essas estratégias que diminuem o número de osteoclastos têm efeitos adversos, pois gera desequilíbrio entre os osteoblastos formadores de osso e os osteoclastos que degradam osso, o que acaba levando a uma má qualidade óssea. Grandes esforços têm sido realizados para contornar a interrupção do *crosstalk* entre as células ósseas no tratamento de doenças líticas⁵⁴.

Assim, outros compostos têm sido pesquisados para o tratamento de doenças ósseas líticas, dentre eles as tanshinonas. As tanshinonas são compostos extraídos da raiz seca da planta medicinal *Salvia miltiorrhiza*, também conhecida como Danshen na medicina tradicional chinesa⁵⁵. Elas são os principais constituintes farmacológicos da Danshen e dão à raiz sua cor marrom-avermelhada⁵⁶. Inúmeras formas farmacêuticas de *S. miltiorrhiza*, como cápsulas, comprimidos, pílulas, soluções para uso oral e injetável estão disponíveis comercialmente na China⁵⁷. Elas são usadas na medicina chinesa para o tratamento de doenças cardiovasculares, como

aterosclerose, acidente vascular cerebral e hiperlipidemia⁵⁸ e doenças esqueléticas, como artrite e osteoporose^{59,60}, entre várias outras. Nos Estados Unidos e na Europa, alguns produtos de Danshen estão disponíveis para uso como “suplementos alimentares”⁵⁷. Existe um grande mercado para os produtos de Danshen nos países asiáticos, bem como um grande interesse no uso de produtos fitoterápicos em todo o mundo^{61,62}.

Dentre os vários tipos de tanshinonas, a tanshinona IIA (TIIA) (Figura 1a) é a mais estudada^{55,63}. Ela exerce efeitos cardioprotetores por meio do aumento da angiogênese, o que pode favorecer o tratamento de determinadas doenças cardiovasculares, e apresenta efeitos imunomoduladores, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios e restaurando as vias de sinalização anormais por meio da regulação da função e ativação das células imunes. A TIIA também pode regular as vias de transdução de sinal, como a via TLR / NF- κ B e a via MAPKs / NF- κ B, apresentando assim papel anti-inflamatório, anticoagulante, antitrombótico e neuroprotetor. Além disso, a TIIA apresenta potencial antitumoral⁶³.

Em relação aos efeitos nas células e tecido ósseo, TIIA mostrou potencial de atuar em diferentes cenários, seja prevenindo, seja tratando a perda óssea nas doenças osteolíticas como osteoporose pós-menopausa^{64,65}. Estudos em animais revelaram que a TIIA preveniu a deterioração esquelética em modelos de osteoporose induzida por deficiência de estrogênio, diabetes e inflamação^{60,64}. A atividade anti-osteoporótica acontece por meio da inibição da osteoclastogênese⁶⁴ e facilitação/promoção da osteoblastogênese^{3,60}. A supressão da osteoclastogênese é exercida principalmente por meio de sua propriedade anti-inflamatória⁶⁰, que ocorre por meio do bloqueio da ativação induzida por RANKL das vias de NF- κ B, MAPK e Akt⁶⁴.

Quando empregada para o tratamento da osteoporose, a TIIA suprime a perda óssea e restaura, em células tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) isoladas de ratas ovariectomizadas, a proliferação, o potencial de multiplicação e diferenciação e suprime a senescência⁶⁵. Foi demonstrado que as BMSCs disfuncionais estão associadas à osteoporose e contribuem para a perda óssea⁶⁶. No tratamento de osteoartrite provocada em ratos, a TIIA inibiu efetivamente a apoptose de condrócitos e a degradação da cartilagem articular por meio da inibição da expressão de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , TNF- α e óxido nítrico no soro⁶⁷.

A injeção direta de TIIA na mucosa gengival reduziu o movimento dentário de molar de ratos, suprimindo a atividade osteoclástica⁶⁸.

Em relação aos efeitos pró-osteogênicos, a TIIA previne a apoptose dos osteoblastos, aumentando a expressão de genes antiapoptóticos e reduzindo a expressão de genes apoptóticos⁶⁹, além de facilitar a osteoblastogênese ao melhorar o estresse oxidativo e a inflamação^{60,70}. Trabalhos mostraram que a TIIA promoveu a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais do ligamento periodontal humano⁷¹, de pré-osteoblastos MC3T3-E1⁷² e de BMSCs, sendo esta última por meio da via de sinalização de BMP e Wnt³. Os pesquisadores sugeriram que TIIA tem potencial para ser aplicada durante a implantação BMSCs em estratégias clínicas de tratamento de doenças ósseas³. Além disso, a TIIA exerceu efeito benéfico no reparo de fratura do fêmur de camundongo; houve aumento do volume da área do calo e da densidade mineral óssea⁷². De acordo com os autores, a TIIA pode ser um medicamento potencialmente eficaz para a cicatrização de fraturas, apesar de mais pesquisas experimentais e clínicas ainda serem necessárias⁷².

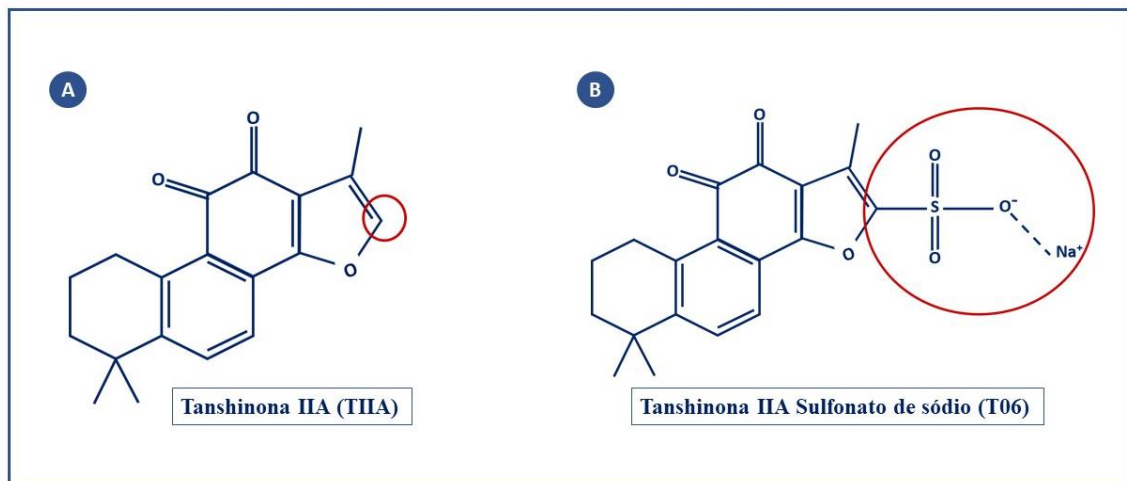
É importante salientar que diferentemente dos antirreabsortivos como estrogênio, bifosfonatos e Denosumabe, que reduzem a população de osteoclastos, a TIIA não exerce somente esse efeito. Ela reduz a osteoclastogênese, mas também induz a formação óssea⁵⁹. Outro potencial efeito da TIIA seria a inibição de CatK⁵⁹. No entanto, não há estudos avaliando especificamente esse efeito da TIIA.

A Tanshinona IIA sulfonato de sódio (T06) é um derivado solúvel da TIIA⁴⁵, obtida pela modificação na sua fórmula molecular, incluindo a cadeia de sulfonação na posição C-16^{55,73} (Figura 1b). Embora TIIA e T06 tenham sido usadas em estudos para as mesmas indicações, as atividades farmacológicas não são todas iguais para ambas devido à diferença na estrutura molecular⁵⁵. Por exemplo, enquanto a T06 preveniu hemorragia cerebral induzida em *zebrafish*, a TIIA apresentou pobre eficácia⁷⁴. Além disso, também há diferenças no metabolismo das duas tanshinonas⁵⁵.

Por outro lado, estudos clínicos e experimentais sugerem que a T06, assim como a TIIA, é eficaz no tratamento de muitas doenças (doenças cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio, aterosclerose, hipertrofia e fibrose cardíaca; doença pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica; sepse; AVC; doenças hepáticas; e reparo de pele), principalmente por seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante, anticoagulante, anti-apoptose e de proteção cardiovascular⁵⁵. Os mecanismos de ação da T06, na sua maioria relacionadas aos efeitos antioxidantes e

anti-inflamatórios, ocorrem por meio da regulação de fatores de transcrição, tais como NF- κ B, Nrf2, Stat1 / 3, Smad2 / 3, Hif-1 α e β -catenina. Canais de Ca²⁺, K⁺ e Cl⁻ também são alvos importantes da T06⁵⁵. Estudos mostraram que T06 reduziu os níveis de expressão de TNF- α , IL-1 β e TGF- β em tecidos de miocárdio infartado⁷⁵, suprimiu a obstrução microvascular e a ação inflamatória em um modelo experimental de falta de perfusão miocárdica⁷⁶, inibiu a expressão de NF- κ B e a liberação de fatores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α e IL-6, em um modelo de sepse em camundongos⁷⁷ e inibiu a expressão de TNF- α e IL-6 induzida por LPS em células endoteliais⁶⁴.

Figura 1 - Estruturas químicas das tanshinona IIa (TIIA) e tanshinona IIa sulfato de sódio (T06).



(A) TIIA, Fórmula Molecular: C₁₉H₁₈O₃, PubChem CID: 164676. (B) T06, Fórmula Molecular: C₁₉H₁₇NaO₆S, PubChem CID: 23669322. Os círculos em vermelho indicam a diferença de posição C-16 entre os grupos TIIA e T06.

Fonte: Zhou et al.⁵⁵

Outro importante efeito da T06 é a inibição de CatK⁵⁴. No entanto, o mecanismo de ação da T06 é diferente dos inibidores de CatK desenvolvidos anteriormente para o controle de osteoporose, como o Odanacatib. A T06 bloqueia especificamente a atividade colagenolítica da CatK. Isso ocorre porque ela se liga a sítios específicos da CatK envolvidos no reconhecimento do substrato (colágeno) ou ligante associado à atividade da colagenase, sendo que o sítio ativo da CatK permanece íntegro e funcional⁵⁴. Se o sítio ativo fosse afetado/bloqueado, haveria os mesmos efeitos adversos cardíacos e dermatológicos provocados pelos inibidores CatK clinicamente testados^{45,54}. Panwar et al.^{45,54} denominaram esse efeito da T06 de inibição ectostérica de CatK.

Em relação aos efeitos nas células e tecido ósseo, estudo in vitro mostrou que a T06 suprimiu a atividade reabsortiva de osteoclastos de humano e de camundongo, sendo que a referida atividade foi totalmente reversível em ambos os tipos de células. Além disso, T06 não inibiu a osteoclastogênese, não afetou a viabilidade dos osteoclastos e não interferiu na degradação do TGF- β 1⁴⁵. Quando administrada, em camundongos ovariectomizados, ela não alterou o número de osteoclastos, induziu aumento significativo da densidade mineral óssea trabecular femoral, melhorou os parâmetros ósseos estruturais, além de aumentar o número de osteoblastos e marcadores de formação óssea. Ela não teve efeito estrogênico no útero, nem mostrou toxicidade hepática e renal, além de não afetar a função cognitiva previamente descrita em camundongos deficientes em CatK. Como não há efeito de T06 na osteoclastogênese, sua atividade antirreabsortiva é atribuída à inibição de CatK⁴⁵. De acordo com os pesquisadores, esse inibidor seletivo da atividade colagenolítica da CatK pode superar as deficiências dos medicamentos direcionados ao sítio ativo da CatK com tendência a efeitos adversos como alterações cardíacas e dermatológicas⁴⁵.

Considerando os efeitos da TIIA na inibição da osteoclastogênese / reabsorção óssea e na promoção da osteoblastogênese / formação óssea⁶⁰, e os efeitos da T06 na inibição da perda óssea via inibição da atividade colagenolítica da CatK⁴⁵, além da atividade anti-inflamatória de ambas^{55,64}, essas substâncias de origem natural podem ser candidatas para auxiliar na prevenção ou no tratamento da periodontite apical.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as tanshinonas IIA e 06, administradas por 10 dias, não tiveram efeito na perda óssea em periodontite apical induzida em camundongos.

REFERÊNCIAS*

1. Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2021;54 (5):712-35.
2. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.
3. Qian K, Xu H, Dai T, Shi K. Effects of Tanshinone IIA on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388(11):1201-9.
4. Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol*. 2014;59(9):944-53.
5. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992;18(9):422-6.
6. Tronstad L. Recent development in endodontic research. *Scand J Dent Res*. 1992;100(1):52-9.
7. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Kobayashi C, Suda H. Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. *J Endod*. 1994;20(1):27-31.
8. Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(3):173-80.
9. Apostolova E, Lukova P, Baldzhieva A, Katsarov P, Nikolova M, Iliev I, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of Fucoidan: a review. *Polymers (Basel)*. 2020;12(10):2338.
10. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 ;79(8 Suppl):1569-76.
11. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1):19-26.
12. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 1989;245(4920):855-7.

* 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>

13. 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.
14. Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*. 2000;291(2):223-34.
15. Ma J, Chen W, Zhang L, Tucker B, Zhu G, Sasaki H, et al. RNA interference-mediated silencing of Atp6i prevents both periapical bone erosion and inflammation in the mouse model of endodontic disease. *Infect Immun*. 2013;81(4):1021-30.
16. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J*. 2011;44(7):583-609.
17. Silva LABD, Lopes ZMS, Sá RC, Novaes Júnior AB, Romualdo PC, Lucisano MP, et al. Comparison of apical periodontitis repair in endodontic treatment with calcium hydroxide-dressing and aPDT. *Braz Oral Res*. 2019;33:e092.
18. 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.
19. 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):1474-9.
20. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol*. 2001;48(1):1-20.
21. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D343-50.
22. Hölzen L, Parigiani MA, Reinheckel T. Tumor cell- and microenvironment-specific roles of cysteine cathepsins in mouse models of human cancers. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2020;1868(7):140423.
23. 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.
24. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta*. 2004;342(1-2):41-69.
25. Kramer L, Turk D, Turk B. The future of cysteine cathepsins in disease management. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(10):873-98.

26. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. *Cells*. 2019;8(3):264.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Wang L, Zhang R, Xiong H, Peng B. The involvement of platelet-derived growth factor-A in the course of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2011;44(1):65-71.
31. Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem*. 2013;394(9):1163-79.
32. Patlaka C, Mai HA, Lång P, Andersson G. The growth factor-like adipokine tartrate-resistant acid phosphatase 5a interacts with the rod G3 domain of adipocyte-produced nidogen-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(3):446-52.
33. Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol*. 1996;74(6):759-75.
34. 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.
35. Liu H, Wang G, Gu W, Mu Y. Cathepsin k: the association between cathepsin k expression and sphenoid sinus invasion of pituitary adenomas. *Med Hypotheses*. 2016;97:88-9.
36. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin k inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocr Rev*. 2017;38(4):325-50.
37. Tezuka K, Tezuka 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.
38. 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.
39. Watanabe R, Okazaki R. Reducing bone resorption by cathepsin K inhibitor and treatment of osteoporosis. *Clin Calcium*. 2014;24(1):59-67.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Yamashita DS, Dodds RA. Cathepsin k and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr Pharm Des*. 2000;6(1):1-24.
44. Pennypacker BL, Chen CM, Zheng H, Shih MS, Belfast M, Samadfam R, et al. Inhibition of cathepsin k increases modeling-based bone formation, and improves cortical dimension and strength in adult ovariectomized monkeys. *J Bone Miner Res*. 2014;29(8):1847-58.
45. Panwar P, Xue L, Søre K, Srivastava K, Law S, Delaisse JM, et al. An Ectosteric Inhibitor of cathepsin k inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 2017;32(12):2415-30.
46. Mullard A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(10):669.
47. Medivir - MIV-711 osteoarthritis trial [homepage na internet]. Suécia: comuna da Huddinge; c2016 [acesso em: 2020 nov 18]. Disponível em: <https://news.cision.com/medivir/r/miv-711-osteoarthritis-trial--successful-third-independent-review-of-safety-data-and-trial-continues,c2144680>
48. Careta MF, Romiti R. Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *An Bras Dermatol*. 2015;90(1):62-73.
49. Tan AY, Zimetbaum P. Atrial fibrillation and atrial fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(6):625-9.
50. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the framingham study. *Stroke*. 1991;22(8):983-8.
51. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(8):746-56.
52. Panwar P, Søre K, Guido RV, Bueno RV, Delaisse JM, Brömme D. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. *Br J Pharmacol*. 2016;173(2):396-410.

53. Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*. 2011;48(4):677-92.
54. Panwar P, Law S, Jamroz A, Azizi P, Zhang D, Ciufolini M, et al. Tanshinones that selectively block the collagenase activity of cathepsin K provide a novel class of ectosteric antiresorptive agents for bone. *Br J Pharmacol*. 2018;175(6):902-23.
55. Zhou ZY, Zhao WR, Zhang J, Chen XL, Tang JY. Sodium tanshinone IIA sulfonate: a review of pharmacological activity and pharmacokinetics. *Biomed Pharmacother*. 2019;118:109362.
56. Dong Y, Morris-Natschke SL, Lee KH. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep*. 2011;28(3):529-42.
57. Hai-Ting Cheng, Xiao-li Li, Xiao-rong Li, Yu-hang Li, Li-juan Wang, Ming Xue. Simultaneous quantification of selected compounds from *Salvia* herbs by HPLC method and their application. *Food Chemistry*. 2012;130(4):1031-5.
58. Wang L, Ma R, Liu C, Liu H, Zhu R, Guo S, et al. *Salvia miltiorrhiza*: a potential red light to the development of cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2017;23(7):1077-97.
59. Guo Y, Li Y, Xue L, Severino RP, Gao S, Niu J, et al. *Salvia miltiorrhiza*: an ancient chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporotic drugs. *J Ethnopharmacol*. 2014;155(3):1401-16.
60. Ekeuku SO, Pang KL, Chin KY. the skeletal effects of tanshinones: a review. *Molecules*. 2021;26(8):2319.
61. Xu RS. Biological and application of *Salvia miltiorrhiza bunge* [internet]. Beijing: Science Press; [1990]. [Acesso em 2021 ago 3]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611011046#section-cited-by>.
62. Zhang Y, Jiang P, Ye M, Kim SH, Jiang C, Lü J. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *Int J Mol Sci*. 2012;13(10):13621-66.
63. Guo R, Li L, Su J, Li S, Duncan SE, Liu Z, et al. Pharmacological activity and mechanism of tanshinone iia in related diseases. *drug des devel ther*. 2020;14:4735-48.
64. Cheng J, Chen T, Li P, Wen J, Pang N, Zhang L, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing nuclear factor- κ B signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(1):26-31.
65. Wang L, Cheng L, Zhang B, Wang N, Wang F. Tanshinone prevents alveolar bone loss in ovariectomized osteoporosis rats by up-regulating phosphoglycerate dehydrogenase. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;376:9-16.

66. Lindtner RA, Tiaden AN, Genelin K, Ebner HL, Manzl C, Klawitter M, et al. Osteoanabolic effect of alendronate and zoledronate on bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from aged female osteoporotic patients and its implications for their mode of action in the treatment of age-related bone loss. *Osteoporos Int*. 2014;25(3):1151-61.
67. Jia PT, Zhang XL, Zuo HN, Lu X, Li L. Articular cartilage degradation is prevented by tanshinone IIA through inhibiting apoptosis and the expression of inflammatory cytokines. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6285-9.
68. Zhang Shi-ying LJZG. Tanshinone type IIA inhibits osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression at relapse stage after orthodontic tooth movement. *Chinese J Tissue Eng Res*. 2014;18(11):1730–6.
69. Zhu S, Wei W, Liu Z, Yang Y, Jia H. Tanshinone-IIA attenuates the deleterious effects of oxidative stress in osteoporosis through the NF- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6969-76.
70. Li J, He C, Tong W, Zou Y, Li D, Zhang C, et al. Tanshinone IIA blocks dexamethasone-induced apoptosis in osteoblasts through inhibiting Nox4-derived ROS production. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13695-706.
71. Liu X, Niu Y, Xie W, Wei D, Du Q. Tanshinone IIA promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK1/2-dependent Runx2 induction. *Am J Transl Res*. 2019;11(1):340-50.
72. Wang Y, Chen H, Zhang H. Tanshinone IIA exerts beneficial effects on fracture healing in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact*. 2019;310:108748.
73. Tian XH, Wu JH. Tanshinone derivatives: a patent review (January 2006 - September 2012). *Expert Opin Ther Pat*. 2013;23(1):19-29.
74. Zhou ZY, Huang B, Li S, Huang XH, Tang JY, Kwan YW, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate promotes endothelial integrity via regulating VE-cadherin dynamics and RhoA/ROCK-mediated cellular contractility and prevents atorvastatin-induced intracerebral hemorrhage in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;350:32-42.
75. Wu P, Du Y, Xu Z, Zhang S, Liu J, Aa N, et al. Protective effects of sodium tanshinone IIA sulfonate on cardiac function after myocardial infarction in mice. *Am J Transl Res*. 2019;11(1):351-60.
76. Long R, You Y, Li W, Jin N, Huang S, Li T, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate ameliorates experimental coronary no-reflow phenomenon through down-regulation of FGL2. *Life Sci*. 2015;142:8-18.
77. Li W, Li J, Ashok M, Wu R, Chen D, Yang L, et al. A cardiovascular drug rescues mice from lethal sepsis by selectively attenuating a late-acting proinflammatory mediator, high mobility group box 1. *J Immunol*. 2007;178(6):3856-64.