

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/03/2025.



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



Angélica Letícia Reis Pavanelli

**Efeito do tratamento sistêmico com tanshinona na modulação da doença
periodontal experimental: estudo em camundongos**

Araraquara
2022



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



Angélica Letícia Reis Pavanelli

Efeito do tratamento sistêmico com tanshinona na modulação da doença periodontal experimental: estudo em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

Coorientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara
2022

P337e

Pavanelli, Angélica Leticia Reis

Efeito do tratamento sistêmico com tanshinona na modulação da doença periodontal experimental : estudo em camundongos / Angélica Leticia Reis Pavanelli. -- Araraquara, 2022

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

Coorientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Catepsina K. 2. Doenças periodontais. 3. Perda do osso alveolar. 4. Osteoclastos. 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.

Angélica Letícia Reis Pavanelli

Efeito do tratamento sistêmico com tanshinona na modulação da doença periodontal experimental: estudo em camundongos

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

2º Examinador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

3º Examinador: Prof. Dr. João Paulo Steffens

4º Examinador: Prof.^a Dr^a. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

5º Examinador: Prof. Dr. Jônatas Caldeira Esteves

Araraquara, 30 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Angélica Letícia Reis Pavanelli

NASCIMENTO: 31 de dezembro de 1990 – Araraquara – SP

FILIAÇÃO: Valdinei Rodrigues Reis
Ana Paula Mutti Reis

2011-2015 Graduação em Administração pelo
Centro Universitário Estácio

2016-2019 Curso de Graduação em Odontologia pela
Universidade de Araraquara – UNIARA

2020-2022 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área
de Periodontia, Nível de Mestrado na Faculdade
de Odontologia pela Faculdade de Odontologia
de Araraquara da Universidade Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”.

Dedico este trabalho...

A **Deus**, pelo dom da vida, por me guiar até aqui. Por me mostrar que tudo posso, pois é Ele quem me fortalece. Por estar presente nos meus momentos de angústia e de alegria. Sou imensamente grata pela oportunidade que Ele me proporcionou em cursar Odontologia, um sonho que se tornou realidade. Agradeço pelas pessoas que Deus colocou na minha vida ao longo dos estudos.

Aos meus pais, Ana Paula e Valdinei, sou grata pela educação e ensinamentos na fé cristã, por todas as leituras bíblicas e tardes nas quais nos reuníamos na sala de casa para meditar na palavra e agradecer a Deus. Pelo incentivo nos estudos desde cedo, por todo esforço que fizeram para que eu e meus irmãos pudéssemos ter o melhor e sempre nos mostrando o caminho correto a seguir, Cristo! Eu amo vocês.

Aos meus irmãos, Mateus e André Thiago, por todo carinho, incentivo, apoio. Por sete anos fui filha única, mas quando vocês chegaram a minha vida de fato se completou e teve mais alegria. Eu amo vocês!

Ao meu esposo, Braian

Por todo apoio, compreensão e carinho durante meus estudos. Por ter sido o primeiro a me incentivar a cursar a graduação, mestrado e futuro doutorado. Por todas as palavras de carinho e amor, por dar sentido e fazer a diferença na minha vida. Tudo com você ao meu lado é mais fácil, mais leve, você é meu porto seguro. Eu te amo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

Muito obrigada querido professor. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança pela paciência em ensinar e me conduzir nesse trabalho. Agradeço a Deus por permitir tê-lo como meu orientador, por confiar no meu potencial, por me encorajar a crescer na vida acadêmica. Sou grata pela sua sinceridade em todo nosso caminhar, pelo seu exemplo como pessoa e profissional. Meu muito obrigada professor, sempre terei o carinho, admiração e respeito.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Pelas orientações, ensinamentos durante o trabalho científico. Por ser tão acolhedor e prestativo em todos os momentos que precisei de esclarecimentos com relação ao mestrado. Por me ensinar a importância de se anotar tudo durante o desenvolvimento do trabalho, por me ensinar a ter paciência e fé nos estudos. Sou grata pela oportunidade que tive de conviver com o senhor, um exemplo de pessoa e profissional. Meu muito obrigada professor.

A Prof^a. Dr^a. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Minhas primeiras aulas no mestrado foram com a professora e eu nunca vou me esquecer da nossa conversa no último dia da disciplina de genética. Professora, você fez toda a diferença para que eu continuasse com os meus estudos. Como a professora mesmo disse “*Meu conselho para você não é como professora e sim como mãe!*” Obrigada, obrigada pelo carinho, pela atenção, por me ensinar a fazer extração e quantificação de RNA e as demais análises de PCR. Eu aprendi muito com você professora, aprendi a ter fé em primeiro lugar e me dedicar em tudo.

A Sãmmea

Por toda parceria durante as atividades desenvolvidas no biotério, por compartilhar comigo momentos de choro e risos. Por ser tão compreensiva e dizer sempre “*Fé que vai dar tudo certo.*” Você foi a primeira pessoa com quem tive contato no mestrado e foi um prazer poder fazer esse trabalho científico com você. Espero ter essa amizade para toda vida. Meu muito obrigada minha amiga.

Ao Ângelo

Por toda ajuda, apoio durante o mestrado, pela amizade que espero levar para toda a vida.

A Camila

Camila, você foi minha orientadora, minha professora, mentora e minha amiga de fato. Obrigada por todos os ensinamentos, dedicação, carinho e atenção para comigo. Sempre se mostrando extremamente prestativa e atenciosa, obrigada pelos conselhos, dicas, pelas conversas e risadas. Obrigada por me acolher, tenho certeza de que nossa amizade permanecerá ao longo de nossas vidas.

Aos amigos da pós-graduação

Aos meus amigos, Ísis de Fátima Balderrama, Maria Eduarda Scordamaia Lopes, Álvaro Pelegrin, Barbara Roque da Silva, Ana Flávia Cassiano, Vitória Fiscarelli, Bruno Graciliano Silva, pela amizade, pelas trocas de experiências e aprendizados.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Ao Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e a Vice-Diretora, Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia.

À Coordenação do Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo coordenador Prof. Dr. Paulo Sergio Cerrrie pela Vice-coordenadora Prof^a. Dr^a. Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili.

Pela enorme admiração, pela competência, dedicação, responsabilidade e exemplo de conduta e profissionalismo.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Odontologia, Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Obrigada por toda formação, orientação e exemplo de dedicação e conduta profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e recursos constantes do Processo CEUA nº 19/2020.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito”.

*Romanos 8,28**

* Bíblia de Jerusalém. Romanos, 8, 28. Nova edição, revista e ampliada. 10ª impressão. São Paulo: Paulus, 2002

Pavanelli ALR. Efeito do tratamento sistêmico com tanshinona na modulação da doença periodontal experimental: estudo em camundongos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

Resumo

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, altamente prevalente, de etiologia multicausal e que se desenvolve como resultado de complexas interações parasita-hospedeiro. Se não tratada, ela resulta na reabsorção do tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado ao redor dos dentes. O processo inflamatório próximo ao esqueleto leva a um fenótipo clínico de perda óssea, observado em diversas patologias, como artrose, artrite reumatoide e doença periodontal (DP). Esse processo é dependente da diferenciação e atividade de osteoclastos, as células responsáveis por reabsorver o tecido ósseo. Desta forma, a inibição da diferenciação ou da atividade dessas células é uma estratégia viável para o controle da reabsorção óssea. A Tanshinona é uma substância natural da *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) que emergiu recentemente como fármacos promissores na redução do fenótipo osteoporótico em camundongos. Tais compostos são capazes de inibir especificamente a atividade colagenolítica da catepsina K, enzima secretada pelos osteoclastos que participa da degradação da fase orgânica da matriz óssea, sem interferir na diferenciação de osteoclastos. Porém, os efeitos desses fármacos na inibição da perda óssea causada por inflamação não estão bem elucidados. Sendo assim, o presente estudo apresenta como objetivo avaliar os efeitos desses fármacos como tratamento sistêmico na modulação da DP experimental. Para isto, foram utilizados camundongos C57BL6/J, machos distribuídos em 4 grupos experimentais (n=10), conforme descritos: grupo doença periodontal (DP), grupo tanshinona TIIA (TIIA), grupo tanshinona T06 (T06), e o Grupo Controle (C). Os animais dos grupos DP, TIIA e T06 receberam indução experimental de DP por meio da colocação de ligaduras. As tanshinonas foram administradas diariamente por 10 dias para o grupo TIIA e T06, e o Grupo DP obteve o tratamento com solução veículo (água) por meio de gavagem oral. Após esse período os animais foram eutanasiados. As amostras obtidas foram utilizadas para avaliação do processo imuno-inflamatório presente no tecido gengival, por meio de análise de RT-PCR em tempo real. A avaliação da perda óssea alveolar foi avaliada por microtomografia computadorizada (μ CT). O grupo DP apresentou significativa perda óssea alveolar, no período de 10 dias, comparado ao grupo controle e os demais grupos TIIA e T06. Houve aumento significativo na expressão gênica do mediador inflamatório IL-1b e na catepsina K envolvida no processo de osteoclastogênese para o grupo DP em relação ao grupo controle. Essas expressões se mostraram menores nos grupos TIIA e T06 comparados ao grupo DP. Com base nos achados do presente estudo, sugere-se que as tanshinonas (TIIA e T06) são estratégias promissoras na modulação da DP experimental em camundongos.

Palavras - chave: Catepsina K. Doenças periodontais. Perda do osso alveolar. Osteoclastos.

Pavanelli ALR. Effect of systemic treatment with tanshinone on the modulation of experimental periodontitis: study in mice [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

Abstract

Periodontitis is a highly prevalent chronic inflammatory disease of multicausal etiology that develops as a result of complex host parasite interactions. If left untreated, it results in the resorption of mineralized and non-mineralized connective tissue of the teeth. The inflammatory process near the skeleton leads to a clinical phenotype of bone loss, observed in several pathologies, such as arthrosis, rheumatoid arthritis and periodontal disease (PD). This process is dependent on the activity of osteoclasts, the cells responsible for the resorption of the bone tissue. This process is dependent on the differentiation and activity of osteoclasts, the cells responsible for resorbing bone tissue. Thus, inhibition of differentiation or activity of these cells is a viable strategy to control bone resorption. Tanshinone is a natural substance from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) that has appeared as promising drugs in reducing the osteoporotic phenotype in mice. Such compounds are capable of specifically inhibiting the collagenolytic activity of cathepsin K, an enzyme secreted by osteoclasts that participates in the degradation of the organic phase of the bone matrix, without interfering with osteoclast differentiation. However, the effects of these drugs in inhibiting bone loss caused by inflammation are not well understood. Therefore, the present study aims to evaluate the effects of these drugs as a systemic treatment in the modulation of experimental PD. For this, C57BL6/J male mice were distributed into 4 experimental groups (n=10), as described: periodontal disease (PD) group, TIIA tanshinone group (TIIA), T06 tanshinone group (T06), and the control Group. (C). The animals in the PD, TIIA and T06 groups received experimental induction of PD through the placement of ligatures. The tanshinones were administered daily for 10 days for the TIIA and T06 groups, and the DP group was treated with vehicle solution (water) through oral gavage. After this period, the animals were euthanized. The samples obtained were used to evaluate the immuno-inflammatory process present in the gingival tissue by means of real-time RT-PCR analysis. Assessment of alveolar bone loss was evaluated by micro computed tomography (μ CT). The PD group showed significant alveolar bone loss within 10 days, compared to the control group and the other TIIA and T06 groups. There was a significant increase in the gene expression of the inflammatory mediator IL-1b and in the cathepsin K involved in the osteoclastogenesis process for the PD group compared to the control group. These expressions were lower in the TIIA and T06 groups compared to the PD group. Based on the findings of the present study, it is suggested that tanshinones (TIIA and T06) are a promising strategy in modulating experimental periodontal disease in mice.

Keywords: Cathepsin K. Periodontal diseases. Alveolar Bone Loss. Osteoclasts.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Tanshinonas.....	23
4.2 Desenho experimental	23
4.3 Indução da doença periodontal.....	24
4.4 Administração das tanhinonas TIIA e T06 (sódio sulfonato)	25
4.5 Sacrifício e coleta das amostras.....	25
4.6 Análise microtomográfica	26
4.7 Reação de polimerase em cadeia (RT-qPCR)	27
4.8 Análise estatística	28
5 RESULTADOS	30
5.1 Análise de μ CT	30
5.2 RT-qPCR.....	33
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA.....	45
APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO	46

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica, de origem multicausal que se desenvolve a partir de complexas interações parasito-hospedeiro associado a presença de um biofilme disbiótico, e que se caracteriza pela destruição das estruturas de suporte do dente como gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cimento^{1, 2}. O início e a progressão da DP estão relacionados a múltiplos fatores etiológicos e de risco, sendo o biofilme bacteriano o principal fator etiológico e o desequilíbrio entre uma infecção localizada e uma resposta inflamatória exagerada do hospedeiro, desempenha papel importante na determinação dos danos as estruturas de suporte dentário³. A periodontite é a principal causa de perda dentária em todo o mundo e um fator de risco significativo para doenças sistêmicas, como diabetes, doenças cardíacas, artrite reumatoide, obesidade, aterosclerose^{3, 4}.

Diversas moléculas e citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes no processo da DP, como por exemplo a Interleucina-1b (IL-1b) e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). A IL-1b pertence à família IL-1 e é produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas. IL-1b induz a ativação transcricional do gene Factor Nuclear kappa B (NF-kb) para expressar moléculas de adesão e citocinas. Também aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial, promovendo o acúmulo de outras células inflamatórias no endotélio⁵. TNF- α além de inibir e matar células tumorais, pode estimular a resposta inflamatória e aumento da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias. Linfócitos estimulados por antígenos como células B e T também são importantes no processo da DP. As funções dos linfócitos T incluem ativar fagócitos, causar apoptose em células infectadas e auxiliar as células B, que além de produzir anticorpos, também são responsáveis por apresentar antígenos às células T^{6, 7}.

Na doença periodontal, o processo reabsorção óssea pode ser observado com o avanço da doença. Esse processo é constituído de várias etapas que começa com a proliferação de precursores de osteoclastos imaturos, depois a diferenciação e maturação desse tipo de célula e, finalmente, a degradação da matriz orgânica e inorgânica do tecido ósseo⁸. A osteoclastogênese é mediada por diversos eventos incluindo moléculas pró-inflamatórias e citocinas assim como o envolvimento do eixo RANKL/RANK/OPG, os quais realizam funções em lesões patológicas envolvendo inflamação crônica. O RANKL trata-se de uma proteína importante na

osteoclastogênese, pois ele liga-se ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos e osteoclastos, motivando a diferenciação dos pré-osteoclastos e a ativação dos osteoclastos maduros, impossibilitando assim a apoptose dos osteoclastos maduros^{9, 10}. A OPG, uma proteína solúvel que age como receptor e tem propriedades adversa ao RANKL, acaba impedindo sua ligação ao RANK, e consequentemente a diminuição da osteoclastogênese. RANKL e OPG super regulados tem se mostrado envolvidos em diversas doenças, como osteoporose, artrite reumatoide, DP. Na doença periodontal quando um desequilíbrio entre essas citocinas ocorre, ocasiona uma produção maior de RANKL, resultando em um aumento da reabsorção óssea e consequentemente na perda dos dentes¹¹.

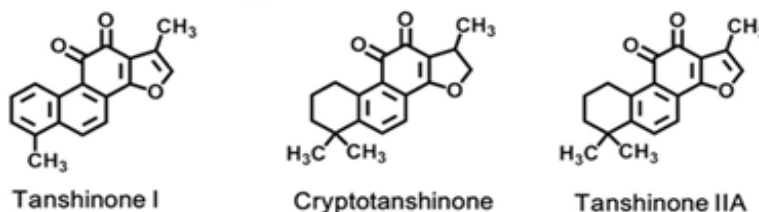
O tratamento da DP inclui mudança de comportamento por parte do paciente como instruções de higiene bucal, cessação do tabagismo, controle de doenças sistêmicas e sequencialmente, o tratamento periodontal não cirúrgico. Este consiste em raspagem e alisamento radicular (RAR) para remoção da placa e cálculo afim de controlar a infecção periodontal e interromper a progressão da doença^{12, 13}. No entanto, mesmo após a conclusão do tratamento não cirúrgico, alguns pacientes podem não apresentar um resultado satisfatório, necessitando assim do uso de terapias adjuvantes. Estudos têm investigado o uso de fármacos que modulam a resposta imune, como terapia adjuvante para as doenças periodontais^{14, 15}.

A catepsina K é uma protease cisteína que está envolvida na regulação da reabsorção óssea e pode ser encontrada em osteoclastos. Elas degradam colágeno tipo I e tipo II, componentes predominantes da matriz extracelular óssea^{16, 17}. Estudos têm evidenciado que poder controlar a expressão da catepsina K frente a reabsorção óssea, pode gerar um efeito terapêutico satisfatório para o sistema ósseo durante a progressão da periodontite^{18, 19}. Agentes moduladores da resposta imune tem se destacado recentemente devido a sua ação inibitória frente a catepsina K, como o odanacatib, e os inibidores de cistatinas²⁰⁻²².

As administrações de compostos naturais como terapia complementar para as DPs têm se mostrado favorável no decorrer dos últimos anos e estudos avaliando os efeitos benéficos do curcumin, fitocistatina, e suplementação com ômega-3 na modulação da resposta imune do hospedeiro, apontaram seus efeitos anti-inflamatório, antirreabsortivo e reparador, o que pode classificar tais compostos naturais como possíveis abordagens terapêuticas adjuvantes para doenças periodontais²³⁻²⁷, como por exemplo a *Salvia miltiorrhiza*, que é uma planta

originária da China e suas raízes podem ser utilizadas após serem secas, obtendo-se um pó. Seu uso segundo a tradicional medicina chinesa pode ser direcionado para o coração, fígado, para tratar distúrbios menstruais, reumatismo, osteoporose, entre outras doenças²⁸. As Tanshinonas são quinonas diterpenóides lipossolúveis isoladas das raízes secas da *Salvia miltiorrhiza*²⁹. As principais tanshinonas isoladas são: 15,16-di-hidrotanshinona (DT), tansinona I (TI), criptotansinona (CT) e tansinona IIA (TIIA)^{30, 31}. Estudos têm investigado a ação das tanshinonas³²⁻³⁴ sendo que um deles relatou que a hidrotanshinona (DT) poderia bloquear seletivamente a atividade da collagenase da Cathepsina K sem interferir na atividade da protease e osteoclastogênese³². Já a TIIA e CT em um experimento in vitro mostraram que possuem efeito anti-inflamatório devido a sua ação em inibir a ativação da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B)³³, apontando assim o potencial das tanshinonas como um agente anti-osteoporótico.

Figura 1 - Estrutura molecular das principais Tanshinonas



Fonte: Elaboração própria.

Recentemente, um derivado solúvel da Tanshinona IIA (TIIA), a Tanshinona-IIA sulfonato (T06), foi sintetizado e caracterizado em relação à sua atividade de inibir a reabsorção óssea³⁴. Tal composto se mostrou eficaz na redução do fenótipo osteoporótico em camundongos fêmeas ovariectomizadas, sem inibir a diferenciação dos osteoclastos, o que torna esse composto bastante promissor³⁴. Em contraste, estudo prévio utilizando a Tanshinona IIA demonstrou o potencial deste composto em inibir osteoclastogênese³⁵. Sua eficácia também foi observada em um estudo in vitro utilizando-se macrófagos da medula óssea de camundongos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). A TIIA inibiu a geração de espécies reativas de oxigênio, destacando sua ação anti-inflamatória por meio da regulação metabólica e redox³⁶. Há estudos sobre a ação efetiva da TIIA na inibição da

atividade da renina e na redução da expressão de angiotensina II (ANG II), uma enzima que desempenha função na indução do desenvolvimento de osteopenia e osteoporose. Tal redução contribuiu para a melhora na densidade mineral óssea em camundongos diabéticos³⁷. Já na consolidação de fraturas, estudo in vitro e in vivo demonstraram que a TIIA possui efeito benéfico, contribuindo para o aumento da deposição de cálcio, atividade de fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo I e aumento da área de calo ósseo. Esses resultados demonstram que a TIIA tem ação positiva também sobre os osteoblastos³⁸.

O mecanismo de proteção da TIIA na diferenciação de osteoclastos foi avaliado por Cheng et al³⁹ em camundongos C57BL/6 fêmeas com ovariectomia. Esse estudo identificou que o tratamento com tanshinona IIA inibiu a ativação mediada por RANKL das vias de sinalização de NF- κ B, MAPK (Proteínas Quinases Ativadas por Mitogênio) e Akt (Proteína quinase B) durante a osteoclastogênese³⁹.

Embora alguns estudos in vitro e in vivo tenham indicado as propriedades anti-inflamatórias e anti-osteolíticas da administração sistêmica das tanshinonas, especialmente para o tratamento de doenças ósseas metabólicas como a osteoporose^{28, 37, 40}, nenhum estudo, até o momento, têm demonstrado os efeitos da administração sistêmica das tanshinonas sobre a reabsorção óssea inflamatória, como no caso das doenças periodontais. Portanto, considerando as características sítio-específica e a natureza inflamatória da DP, e a capacidade antirreabsortiva e anti-inflamatória da Tanshinona, este estudo foi delimitado com o objetivo de avaliarmos o efeito do tratamento sistêmico das tanshinonas TIIA e T06 na modulação da doença periodontal experimental em camundongos.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados nesse estudo, sugere-se que as tanshinonas TIIA e T06 são eficazes na modulação da doença periodontal experimental in vivo, nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS*

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17038.
2. Natto ZS, Abu Ahmad RH, Alsharif LT, Alrowithi HF, Alsini DA, Salih HA et al. Chronic Periodontitis Case Definitions and Confounders in Periodontal Research: A Systematic Assessment. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 4578782.
3. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018; 89(1):159-72.
4. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000*. 2000; 84(1): 14-34.
5. Becerra-Ruiz JS, Guerrero-Velázquez C, Martínez-Esquivias F, Martínez-Pérez LA, Guzmán-Flores JM. Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. *Oral Dis*. 2021.
6. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017; 75 (1): 116-51.
7. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK, Miranda LA. T helper cells participation on chronic periodontitis. *R. Periodontia*. 2009; 19(2): 7-13.
8. Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcoat J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: Celular and molecular mechanisms. *J Periodont Res*. 1993; 28(6): 478-86.
9. Andrade FR, Sousa DP, Mendonça EF, Silva TA, Lara VS, Batista AC. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(4): 548-55.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res.* 2006; 41(4): 354-60.
11. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontol Res.* 2003; 38(4): 380-7.
12. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008; 79(8): 1569-76.
13. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *J Dent Res.* 2021; 100(8): 798-809.
14. Prietto NR, Martins TM, Santinoni CDS, Pola NM, Ervolino E, Bielemann AM, Leite FRM. Treatment of experimental periodontitis with chlorhexidine as adjuvant to scaling and root planing. *Arch Oral Biol.* 2020; 110: 104600.
15. Muniz FW, de Oliveira CC, de Sousa Carvalho R, Moreira MM, de Moraes ME, Martins RS. Azithromycin: a new concept in adjuvant treatment of periodontitis. *Eur J Pharmacol.* 2013; 705(1-3): 135-9.
16. 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): 325-350.
17. Zeng GZ, Pan XL, Tan NH, Xiong J, Zhang YM. Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. *Eur J Med Chem.* 2006; 41(11): 1247-52.
18. Lecaille F, Kaleta J, Brömme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev.* 2002; 102(12): 4459-88.
19. Wen X, Yi LZ, Liu F, Wei JH, Xue Y. The role of cathepsin K in oral and maxillofacial disorders. *Oral Dis.* 2016; 22(2): 109-15.
20. Stralberg F, Henning P, Gjertsson I, Kindlund B, Souza PP, Persson E, et al. Cysteine proteinase inhibitors regulate human and mouse osteoclastogenesis by interfering with RANK signaling. *FASEB J.* 2013; 27(7): 2687-701.

21. Str.lberg F, Kassem A, Kasprzykowski F, Abrahamson M, Grubb A, Lindholm C, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo by cysteine proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol.* 2017; 101(5): 1233-43.
22. Martinez M, Santamaria ME, Diaz-Mendoza M, Arnaiz A, Carrillo L, Ortego F, et al. Phytocystatins: Defense Proteins against Phytophagous Insects and Acari. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10): 1747.
23. Leguizamon NDP, Rodrigues EM, de Campos ML, Nogueira AVB, Viola KS, Schneider VK, et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory and pro-osteogenic effects of citrus cystatin CsinCPI-2. *Cytokine.* 2019; 123: 1547-60.
24. Da Ponte Leguizamón, N et al. Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *Journal of dental research.* 2022; 101(2): 216-225.
25. Curylofo-Zotti FA, Elburki MS, Oliveira PA, Cerri PS, Santos LA, Lee HM, et al. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. *Archives of oral biology.* 2018; (91): 42-50.
26. de Almeida Brandão D, Spolidorio LC, Johnson F, Golub LM, Guimarães-Stabili MR, Rossa C Jr. Dose-response assessment of chemically modified curcumin in experimental periodontitis. *Journal of periodontology.* 2019; 90(5): 535-45.
27. Kujur SK, Goswami V, Nikunj AM, Singh G, Bandhe S, Ghritlahre H. Efficacy of omega 3 fatty acid as an adjunct in the management of chronic periodontitis: A randomized controlled trial. *Indian J Dent Res.* 2020; 31(2): 229-35.
28. 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.
29. Liu QY, Zhuang Y, Song XR, Niu Q, Sun QS, Li XN, et al. Tanshinone IIA prevents LPS-induced inflammatory responses in mice via inactivation of succinate dehydrogenase in macrophages. *Acta Pharmacol Sin.* 2021; 42(6): 987-997.
30. 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 Mar;28(3):529-42.

31. Li YG, Song L, Liu M, Hu ZB, Wang ZT. Advancement in analysis of *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen). *J Chromatogr A*. 2009 Mar 13;1216(11):1941-53.
32. Panwar P, S  e 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.
33. Xing L, Tan ZR, Cheng JL, Huang WH, Zhang W, Deng W, et al. Bioavailability and pharmacokinetic comparison of tanshinones between two formulations of *Salvia miltiorrhiza* in healthy volunteers. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 4709.
34. Panwar P, Xue L, Soe 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.
35. Kwak HB, Yang D, Ha H, Lee JH, Kim HN, Woo ER, et al. Tanshinone IIA inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1. *Exp Mol Med*. 2006; 38(3): 256-64.
36. Liu QY, Zhuang Y, Song XR, Niu Q, Sun QS, Li XN, Li N, Liu BL, Huang F, Qiu ZX. Tanshinone IIA prevents LPS-induced inflammatory responses in mice via inactivation of succinate dehydrogenase in macrophages. *Acta Pharmacol Sin*. 2021; 42(6): 987-97.
37. Zhang J, Cai Z, Yang M, Tong L, Zhang Y. Inhibition of tanshinone IIA on renin activity protected against osteoporosis in diabetic mice. *Pharm Biol*. 2020; 58(1): 219-24.
38. 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.
39. Cheng L, Zhou S, Zhao Y, Sun Y, Xu Z, Yuan B, et al. Tanshinone IIA attenuates osteoclastogenesis in ovariectomized mice by inactivating NF-Kb and Akt signaling pathways. *Am J Transl Res*. 2018; 10(5): 1457-68.
40. Gao Z, Lu Y, Halmurat Upur, Jing J, Xu D. Study of osteoporosis treatment principles used historically by ancient physicians in Chinese Medicine. *Chin J Integr Med*. 2013; 19(11): 862-8.

41. Ren ZH, Tong YH, Xu W, Ma J, Chen Y. Tanshinone II A attenuates inflammatory responses of rats with myocardial infarction by reducing MCP-1 expression. *Phytomedicine*. 2010; 17(3-4): 212-8.
42. Wang X, Fan J, Ding X, Sun Y, Cui Z, Liu W. Tanshinone I Inhibits IL-1 β -Induced Apoptosis, Inflammation And Extracellular Matrix Degradation In Chondrocytes CHON-001 Cells And Attenuates Murine Osteoarthritis. *Drug Des Devel Ther*. 2019; 13: 3559-68.
43. Zhou B, Li LH, Tan LM, Luo WB, Xiong H, Lu XL et al. Tanshinone IIA Ameliorates Inflammation Response in Osteoarthritis via Inhibition of miR-155/FOXO3 Axis. *Pharmacology*. 2021; 106(1-2): 20-8.
44. Rychel JK. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top Companion Anim Med*. 2010; 25(1): 20-5.
45. Taruc-Uy RL, Lynch SA. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Prim Care*. 2013; 40(4): 821-36.
46. Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am*. 2020; 104(2): 293-311.
47. 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): 6285-89.
48. Lin H, Wei B, Li G, Zheng J, Sun J, Chu J et al. Sulforaphane reverses glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblastic cells through regulation of the Nrf2 pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2014; 8: 973-82.
49. Hsu E, Nanes M. Advances in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017; 24(6): 411-17.
50. Weinstein RS. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med*. 2011; 365(1): 62-70.
51. 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.

52. Chen Z, Buki K, Vääräniemi J, Gu G, Väänänen HK. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One*. 2011 Apr 8;6(4):e18689.
53. Stark Z, Savarirayan R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009 Feb 20;4:5.
54. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell*. 2021; 184(5): 1330-47.
55. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9 Suppl 1(Suppl 1):S1.
56. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005; 11(2): 76-81.
57. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract*. 2012; 66(12): 1139-46.
58. Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1218: 38-46.
59. Ristow O, Gerngroß C, Schwaiger M, Hohlweg-Majert B, Kehl V, Jansen H et al. Effect of antiresorptive drugs on bony turnover in the jaw: denosumab compared with bisphosphonates. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 52(4): 308-13.
60. Eisman JA, Bone HG, Hosking DJ, McClung MR, Reid IR, Rizzoli R et al. Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: three-year continued therapy and resolution of effect. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(2): 242-51.
61. Gauthier JY, Chauret N, Cromlish W, Desmarais S, Duong LT, Falgout JP et al. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18(3): 923-8.
62. Brömme D, Panwar P, Turan S. Cathepsin K osteoporosis trials, pycnodysostosis and mouse deficiency models: Commonalities and differences. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(5):457-72.
63. Cui L, Wu T, Liu YY, Deng YF, Ai CM, Chen HQ. Tanshinone prevents cancellous bone loss induced by ovariectomy in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(5): 678-84.

64. 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.
65. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, Finoti LS, Toffoli GB, Spolidorio DM, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(6): 1203-16.
66. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*. 2014; 85(3): 465-77.
67. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014; 64(1): 57-80.
68. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International journal of oral science*. 2019; 11(3): 30.
69. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*. 2015; (2015): 615486.
70. Teitelbaum, S L. Bone resorption by osteoclasts. *Science (Nova York, NY)*. 2000; 289(5484): 1504-8.