



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



Victor Hugo Fernandes Vasconcelos

**Efeito da Tanshinona-IIa-sulfonato, um inibidor ectostérico da catepsina k, na
osteoclastogênese induzida por LPS**

Araraquara

2022



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



Victor Hugo Fernandes Vasconcelos

Efeito da Tanshinona-Ila-sulfonato, um inibidor ectostérico da catepsina k, na osteoclastogênese induzida por LPS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Nome do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Araraquara

2022

V331e

Vasconcelos, Victor Hugo Fernandes

Efeito da Tanshinona-IIa-sulfonato, um inibidor ectostérico da catepsina k, na osteoclastogênese induzida por LPS / Victor Hugo Fernandes Vasconcelos. -- Araraquara, 2022

62 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Pedro Paulo Chaves de Souza

1. Osteoclastos. 2. Catepsina K. 3. Lipopolissacarídeos. 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.

Victor Hugo Fernandes Vasconcelos

Efeito da Tanshinona-IIa-sulfonato, um inibidor ectostérico da catepsina k, na osteoclastogênese induzida por LPS

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

2º Examinador: Profa. Dra. Elisandra Gava de Castro

3º Examinador: Profa. Dra. Gisele Faria

Araraquara, 07 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Victor Hugo Fernandes Vasconcelos

NASCIMENTO: 27/10/1996 – Goiânia – Goiás

FILIAÇÃO: Marlon Vasconcelos da Silva
Selma Bueno Fernandes Vasconcelos

2015-2021: Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Goiás

2020-2022: Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Periodontia
Nível: Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista - UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus, a força motora da minha vida.

Aos meus pais, Marlon e Selma, por me incentivarem e serem a sustentação da minha caminhada. Mesmo não sabendo de modo detalhado os objetos de estudo da minha pesquisa, compreenderam os finais de semana ausentes e os dias em que era necessário estender o tempo de laboratório. Sem a contribuição dada por eles certamente eu não chegaria até aqui.

Ao meu irmão, Vinícius, por ser companheiro, ajudador e incentivador na minha vida.

À minha namorada, Mariana, por me mostrar que a vida compartilhada a dois é mais leve e duradoura. Sua companhia nos dias difíceis serviu como remédio que consola as frustrações.

Aos colegas de laboratório, equipe iBioM, Toxin e todo o edifício LIFE, por compartilharem das lutas e glórias vivenciadas na rotina da ciência. Trabalhar em um ambiente tão acolhedor é uma dádiva. Em especial, à minha amiga Glaucia, pelo tempo compartilhado em laboratório, por todo incentivo e pelos ensinamentos, essenciais para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Pedro, por acreditar em mim, por ser amigo, e despende do seu tempo para partilhar valores inestimáveis.

Ao CNPq:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 132186/2020-9.

“É necessário que haja boa filosofia, se não por outra razão, porque a filosofia ruim precisa de uma resposta”

*Lewis, C.S. O peso da glória. 1º edição – Rio de Janeiro: Thomas Nelson Brasil, 2017.

Vasconcelos VHF. Efeito da Tanshinona-IIa-sulfonato, um inibidor ectostérico da catepsina k, na osteoclastogênese induzida por LPS [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A Tanshinona-IIa-sulfonato (T06) é um derivado da Tanshinona IIA, substância natural da *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), uma erva utilizada na Medicina Tradicional Chinesa. Essa classe de compostos emergiu recentemente como fármacos promissores na redução do fenótipo osteoporótico. Tais compostos são capazes de inibir especificamente a atividade colagenolítica da Catepsina K, enzima lisossomal secretada pelos osteoclastos que participa da degradação da fase orgânica da matriz óssea, sem interferir na osteoclastogênese induzida por RANKL. Entretanto, ainda não foi investigado o efeito da T06 sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS). O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da T06 sobre a osteoclastogênese induzida por LPS *in vitro*. Para isso, macrófagos foram obtidos de medula óssea (BMMs) de camundongos e a viabilidade avaliada após exposição à variadas concentrações de tanshinona [0,25-5µM], utilizando o ensaio de redução do MTT. As células foram estimuladas à diferenciação com MCSF, RANKL e/ou LPS na presença ou ausência de T06 por 4 dias, em placa de 96 poços. Sobre discos de osso, BMMs foram primadas com RANKL e estimuladas com LPS na presença ou ausência de T06 [1µM]. As células foram fotografadas em microscopia de campo claro, para contagem de células TRAP+, e de fluorescência, para visualização dos anéis de actina. O sobrenadante da cultura foi coletado para quantificação de citocinas inflamatórias. Os resultados desse trabalho mostraram que T06 modulou positivamente a osteoclastogênese induzida por LPS em placas de cultura, sendo esse resultado estatisticamente relevante ($p < 0,05$) nas concentrações [2,5 e 0,5µM]. Osteoclastos induzidos por LPS e tratados com T06 apresentaram anéis de actina normais. Em discos de osso, o tratamento com T06 [1µM] aumentou significativamente a quantidade de células multinucleadas TRAP+. A indução da osteoclastogênese com LPS aumentou os níveis de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6 e MCP-1), enquanto o tratamento com T06 não interferiu nesse mecanismo.

Palavras-chave: Osteoclastos. Catepsina k. Lipopolissacarídeo.

Vasconcelos VHF. Effect of Tanshinone-IIa-sulfonate, an ectosteric cathepsin k inhibitor, on LPS-induced osteoclastogenesis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Tanshinone IIa sulfonic sodium (T06) is a derivative of Tanshinone IIA, a natural substance from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), an herb used in traditional Chinese Medicine. This class of compounds has recently emerged as promising drugs in reducing the osteoporotic phenotype. Such compounds are able to specifically inhibit the collagenolytic activity of Cathepsin K, a lysozyme secreted by osteoclasts that participates in the degradation of the organic phase of the bone matrix, without interfering with RANKL-induced osteoclastogenesis. However, the effect of T06 on lipopolysaccharide (LPS)-induced osteoclast differentiation and activity has not yet been investigated. The aim of the present study was to investigate the effect of T06 on LPS-induced osteoclastogenesis in vitro. To this end, bone marrow macrophages (BMMs) were obtained from mice and viability assessed after exposure to varying concentrations of tanshinone [0.25-5 μ M] using the MTT reduction assay. Cells were stimulated to differentiation with MCSF, RANKL and/or LPS in the presence or absence of T06 for 4 days in a 96-well plate. On bone discs, BMMs were primed with RANKL and stimulated with LPS in the presence or absence of T06 [1 μ M]. Cells were photographed in brightfield microscopy, for counting TRAP⁺ cells, and fluorescence microscopy, for visualization of actin rings. The culture supernatant was collected for quantification of inflammatory cytokines. The results of this work showed that T06 positively modulated LPS-induced osteoclastogenesis in culture plates, and this result was statistically relevant ($p < 0.05$) at concentrations [2.5 and 0.5 μ M]. Osteoclasts induced by LPS and treated with T06 showed normal actin rings. In bone discs, treatment with T06 [1 μ M] significantly increased the amount of TRAP⁺ multinucleated cells. Induction of osteoclastogenesis with LPS increased the levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-6 and MCP-1), while treatment with T06 did not interfere with this mechanism.

Keywords: Osteoclasts. Cathepsin k. Lipopolysaccharides

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Biologia dos osteoclastos	14
3.2 Catepsina k	17
3.3 Estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças osteolíticas.....	18
3.4 Catepsina k como alvo terapêutico	19
4 MATERIAL E MÉTODO	22
4.1 Animais	22
4.2 Isolamento de macrófagos de medula óssea	22
4.3 Ensaio de citotoxicidade	23
4.4 Ensaio de osteoclastogênese induzida por LPS	24
4.5 Ensaio de osteoclastogênese sobre disco de osso.....	25
4.6 Microscopia de fluorescência	25
4.7 Análise da expressão de citocinas inflamatórias	26
4.8 Análise estatística	26
5 RESULTADOS	28
5.1 T06 estimula a osteoclastogênese em cultura de BMMs.....	28
5.2 T06 estimula a osteoclastogênese induzida por LPS sobre discos de osso	31
5.3 T06 não altera a expressão de citocinas inflamatórias.....	32
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE A – Artigo redigido para publicação	44
ANEXO A – Certificado de Comitê de Ética	62

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado altamente vascular, adaptado para suportar o corpo e prover alavancagem para os movimentos. A homeostase óssea é preservada a partir da comunicação e ação conjunta das células que compõem o tecido ósseo. Osteoclastos, células que degradam osso a partir da secreção de ácido e enzimas proteolíticas, como a catepsina k (CTSK), e osteoblastos, células formadoras de osso responsáveis pela produção de proteínas extracelulares como osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I, atuam de forma ordenada renovando o tecido e preservando a massa óssea¹. Em certas condições patológicas, porém, as ações dessas células são desacopladas, geralmente resultando em perda de estrutura orgânica e mineral. O fenótipo osteolítico observado na osteoporose, artrite reumatoide e periodontite, por exemplo, é, na maior parte das vezes, decorrente da hiperativação e/ou atividade dos osteoclastos².

A via RANK/RANKL/OPG regula a diferenciação osteoclástica. As células precursoras hematopoiéticas aumentam a expressão do receptor ativador de NF- κ B (RANK) quando expostas ao fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). A ligação de RANK ao seu ligante, RANKL, induz a diferenciação dos precursores de osteoclastos em células da linhagem osteoclástica e, finalmente, a fusão das células mononucleares, gerando células multinucleadas capazes de reabsorver osso, os osteoclastos propriamente ditos. Osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína ubiquamente secretada pertencente à família do fator de necrose tumoral, que se liga a RANKL. A ligação OPG/RANKL impede a ligação RANK/RANKL e inibe a osteoclastogênese³.

Além da via canônica dependente de M-CSF e RANKL, produtos bacterianos também modulam a diferenciação osteoclástica *in vitro* e *in vivo*⁴. O lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa das bactérias, é capaz de inibir ou estimular a osteoclastogênese, a depender do estágio de diferenciação das células precursoras de osteoclastos. LPS de *E. coli*, por exemplo, se liga aos receptores Tipo Toll (TLR) e induz a expressão de fatores de transcrição importantes para a osteoclastogênese, como NF- κ B e MAPK. Além disso, LPS de *P. gingivalis* ativa receptores TLR2 em osteoblastos, aumentando a produção de RANKL^{5,6}. Nesse contexto, modelos de osteoclastogênese induzida por componentes

bacterianos mimetizam alguns dos mecanismos envolvidos em doenças osteolíticas inflamatórias associadas à presença de biofilme, como na periodontite^{7,8}.

CTSK é uma protease lisossomal expressa por várias células que tem como alvo catalítico o aminoácido cisteína. Fundamental na homeostase óssea, CTSK liberada por osteoclastos age no processo de degradação da matriz óssea desmineralizada, através da degradação de fibras colágenas e ativação de outras enzimas catalíticas^{9,10}. Sabe-se que a supressão de CTSK pode prevenir a reabsorção óssea sem prejudicar processos osteogênicos. Por conta disso, a indústria farmacêutica tem desenvolvido inibidores direcionados à CTSK para o tratamento das doenças osteolíticas¹¹. O Odanacatib, inibidor mais promissor até o momento, foi testado in vitro, em modelos animais e em humanos, chegando à fase III de ensaios clínicos^{12,13}. O estudo foi encerrado devido a um aumento imprevisto de eventos cerebrovasculares, mas a eficácia do Odanacatib na prevenção de fraturas deu contornos promissores à essa classe de fármacos^{14,15}.

Recentemente, Tanshinona-IIA-sulfonato (T06), um derivado solúvel da Tanshinona IIA, componente abundante da *Salvia miltiorrhiza*, planta amplamente utilizada na medicina chinesa, se mostrou capaz de inibir seletivamente a atividade colagenolítica da CTSK, sem interferir em outros sítios ativos da enzima. O tratamento com T06 diminuiu a reabsorção óssea induzida por RANKL em osteoclastos humanos e de camundongos in vitro e reduziu o fenótipo osteoporótico em ratas ovariectomizadas. A capacidade de prevenir a reabsorção óssea sem interferir na atividade dos osteoblastos, um diferencial dos inibidores de CTSK, associada ao efeito seletivo observado no tratamento com T06 fornece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de antirreabsortivos específicos, com baixa associação à efeitos colaterais¹⁶. Não se sabe, porém, o efeito desse composto em um modelo de osteoclastogênese induzido por componentes bacterianos.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o potencial da T06 em inibir a osteoclastogênese induzida por LPS in vitro.

2.1 Objetivos Específicos

1. Analisar o perfil de citotoxicidade da T06 sobre osteoclastos, utilizando o método da redução do MTT
2. Avaliar o efeito da T06 na osteoclastogênese induzida por LPS em placas de cultura e sobre discos de osso
3. Investigar o efeito da T06 na expressão de citocinas inflamatórias

3 REVISÃO DA LITERATURA

O tecido ósseo fornece suporte estrutural para todo o corpo, proteção de órgãos e estruturas vitais, auxilia no movimento dos músculos, regula a homeostase mineral e ainda aloja e protege a medula óssea. Enquanto na infância e adolescência o esqueleto humano passa por crescimento, sobretudo, longitudinal e radial, a dinâmica do esqueleto adulto passa por dois processos distintos, denominados modelação e remodelação. As células ósseas respondem à estímulos fisiológicos, inflamatórios ou forças mecânicas promovendo maior reabsorção ou formação óssea, a fim de ajustar o esqueleto às forças aplicadas; nesse processo, denominado modelação óssea, a forma e tamanho do osso são alterados. Já na remodelação, a homeostase mineral está em ênfase, ocorrendo a remoção contínua de osso maduro e a subsequente substituição por uma matriz óssea proteica recém-sintetizada. Deste modo, a forma e tamanho do osso não se alteram^{3,17}.

A dinâmica de modelação e remodelação óssea só é possível graças a interação entre as diferentes células do tecido ósseo; coordenadamente, osteoblastos e osteoclastos formam uma estrutura anatômica temporária, localizada tanto no osso cortical quanto no osso trabecular, denominada Unidade Multicelular Básica¹⁸. Osteócitos, células originadas de osteoblastos e aprisionadas na matriz óssea, e osteomorfos, descritos recentemente como células resultantes da fissão de osteoclastos e recicladas a partir de estímulos induzidos por RANKL, também compõem o tecido ósseo e participam das interações celulares críticas no metabolismo ósseo^{2,19}. A diferenciação e atividade das células ósseas definem, então, maior atividade reabsortiva ou osteogênica. A expressão de diferentes citocinas, hormônios, fatores de crescimento e fatores de transcrição, assim como pelas interações entre os tipos celulares, modulam a dinâmica das células ósseas, ativando ou inibindo múltiplas vias de sinalização^{1,20}.

3.1 Biologia dos osteoclastos

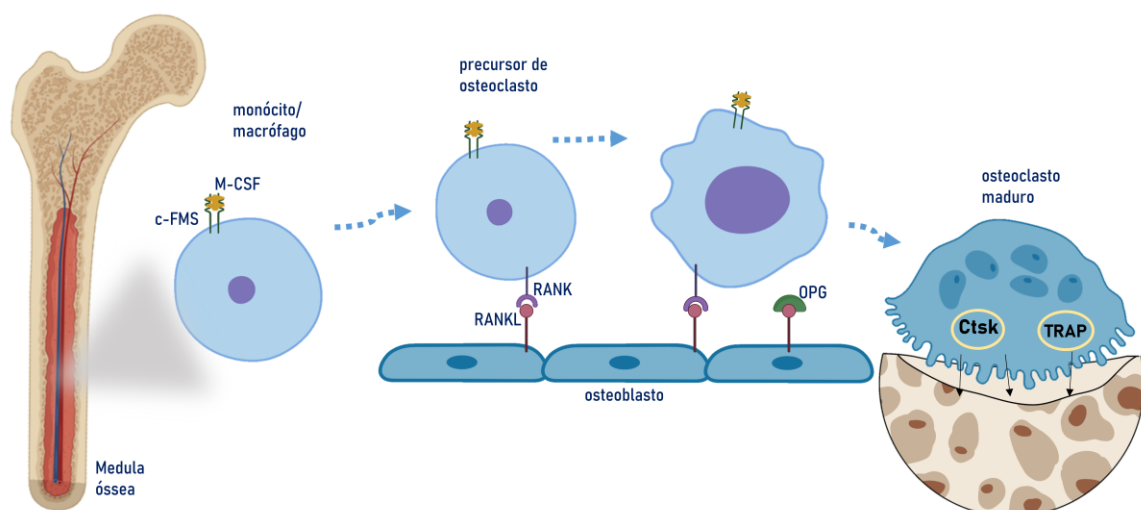
Osteoclastos são células multinucleadas formadas a partir da exposição de precursores hematopoiéticos monocíticos ao fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), citocina ubiquamente expressa e essencial para a proliferação, motilidade e sobrevivência desse tipo celular^{21,22}, e de ativador do

receptor de NF- κ B (RANKL), uma citocina pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) expressa por osteoblastos, osteócitos³, células do ligamento periodontal e do sistema imunológico^{4,23}.

A ligação de M-CSF no receptor do fator estimulador de colônias-1 (c-FMS) induz a expressão do receptor ativador de NF- κ B (RANK), um receptor para RANKL^{3,24}. A ligação RANK/RANKL ativa diferentes vias de sinalização levando à diferenciação, fusão e ativação dos osteoclastos. A deficiência ou superexpressão de RANKL em camundongos resulta em distúrbios do metabolismo ósseo: osteopetrose e osteoporose, respectivamente, o que evidencia a importância desse eixo na regulação da osteoclastogênese^{25,26}.

A regulação negativa, que completa a via canônica da diferenciação osteoclástica (RANK/RANKL/OPG) (FIG. 1), se dá pela expressão de seu terceiro protagonista, a osteoprotegerina (OPG), uma glicoproteína secretada e sintetizada ubiquamente. Como um receptor de afinidade de ligação ao RANKL, OPG é capaz de bloquear a interação RANK/RANKL, regulando negativamente a diferenciação e ativação dos osteoclastos^{1,27}. OPG é expressa ubiquamente, porém, o controle local da sua expressão, sobretudo em osteoblastos, é que regula a massa óssea^{28,29}.

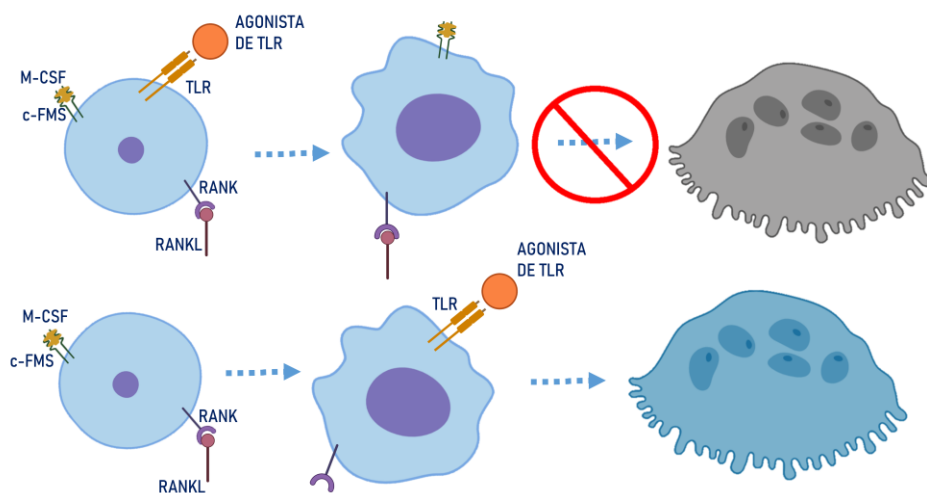
Figura 1 - Diferenciação de osteoclastos (RANK/RANKL/OPG)



Fonte: Elaboração própria

Outros mecanismos e vias de sinalização também estão envolvidos na regulação da osteoclastogênese *in vitro* e *in vivo*. Macrófagos oriundos de medula óssea expressam 9 dos 13 membros da família dos receptores tipo Toll (TLR) e uma variedade de agonistas de TLRs modulam a via de sinalização induzida por RANKL⁴. O tratamento concomitante de RANKL e lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, um ativador de TLR4, em progenitores de osteoclastos, inibe a diferenciação osteoclástica por um mecanismo que impede a ativação de Nfatc1^{4,30,31}. Entretanto, quando esses progenitores são primados com RANKL e depois tratados com LPS, a ativação de TLR4 é capaz de induzir a osteoclastogênese, não inibindo a expressão de Nfatc1^{5,32}. Em modelos de co-culturas de osteoblastos e macrófagos, a ativação de agonistas de TLR em osteoblastos aumenta a expressão de RANKL e outras citocinas inflamatórias, induzindo a osteoclastogênese de maneira indireta^{4,6} (FIG. 2).

Figura 2 - Modulação da osteoclastogênese por agonistas de TRL



Fonte: Elaboração própria, adaptado de Souza, P., Lerner, U. H. (2019).

Osteoclastos expressam receptores de integrina que se ligam aos peptídeos da matriz óssea; o contato com a matriz óssea mineralizada leva a polarização dessas células. Dessa maneira, o citoesqueleto fibrilar de actina do osteoclasto altera sua conformação promovendo a formação de uma zona de selamento no entorno da fixação do osteoclasto à matriz. O processo de reabsorção ocorre a partir

da liberação de íons H^+ pelos osteoclastos, que ajudam a acidificar o meio e solubilizar o componente mineral inorgânico, e de enzimas lisossomais e endossomais, como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), metaloproteinase 9 (MMP-9) e CTSK, proteases capazes de remover a matriz orgânica, principalmente colágeno tipo I. Esse fluxo enzimático, inclusive, faz com que a superfície celular direcionada à matriz óssea se configure em um padrão ondulado, conhecido como “borda em escova”^{17,33}.

3.2 Catepsina k

Das enzimas secretadas por osteoclastos na lacuna de reabsorção, destaca-se a CTSK, uma protease semelhante à papaína, membro da família da catepsina de proteases lisossomais, tendo como alvo catalítico o aminoácido cisteína³⁴. Osteoblastos³⁵, osteócitos³⁶, odontoclastos, células do ligamento periodotal³⁷, neurônios, células epiteliais brônquicas e alveolares, fibroblastos e células cardiovasculares^{38,39} também expressam CTSK.

No osso, CTSK é fundamental para o processo de reabsorção, sendo capaz de clivar a hélice tripla e os telopeptídeos das fibras de colágeno tipo I, que constitui 90% da matriz orgânica óssea⁴⁰. Além disso, essa protease também pode ativar MMP-9⁴¹ e degradar colágeno tipo II⁴² e osteonectina^{39,43}.

Mutações de perda de função no gene *CTSK* em humanos contribuem para a patogênese de uma doença autossômica recessiva rara conhecida como picnodisostose⁴⁴. Osteoclastos de indivíduos com picnodisostose não degradam matriz orgânica óssea, apresentando um fenótipo semelhante ao de pacientes com osteopetrose. Esses indivíduos apresentam aumento de densidade mineral óssea, mas também mais risco à fraturas¹⁵. Em camundongos, a deficiência de *Ctsk* contribuiu para o aumento da densidade mineral óssea associado à maior resistência à fratura e maior reparo ósseo⁴⁵. Além disso, camundongos com deleção para CTSK apresentaram maior quantidade de osteoclastos que camundongos selvagens, alterando processos de senescência e apoptose osteoclásticos⁴⁶.

O papel da CTSK tem sido amplamente investigado também em outros tecidos e sistemas. A deficiência de CTSK em camundongos parece diminuir a integridade da barreira hematoencefálica e estar associada a maior risco de desenvolvimento de edema cerebral, déficit neurológico e fibrose pulmonar^{38,47}. Por

outro lado, knockout da CTSK demonstrou ter efeito no sistema cardiovascular, melhorando a função cardíaca e atenuando casos de hipertrofia induzida pelo envelhecimento e dieta rica em gordura em camundongos^{48,49}.

A atividade da CTSK é regulada por inibidores endógenos de cisteína-proteinases, como a cistatina C, que possui alta afinidade de ligação a esta classe de enzimas⁵⁰. Essas proteínas são capazes de inibir a osteoclastogênese induzida pelo hormônio da paratireóide (PTH), 1,25(OH)₂-vitamina D₃ ou interleucina-6 (IL-6) em cultura de macrófagos de medula óssea de camundongos e a reabsorção óssea in vitro estimulada pelo hormônio da paratireóide^{51,52}. Recentemente, nosso grupo demonstrou que um inibidor derivado da *Citrus sinensis*, uma fitocistatina, foi capaz de controlar o processo inflamatório e inibir a osteoclastogênese e a perda óssea alveolar em um modelo de indução de periodontite em camundongos⁵³.

3.3 Estratégias farmacológicas para o tratamento de doenças osteolíticas

Desordens no metabolismo das células ósseas estão envolvidas na patogenia das doenças osteolíticas, incluindo osteoporose, artrite reumatoide e periodontite. Enquanto a osteoporose está relacionada a disfunções hormonais, como a baixa produção de estrogênio pós-menopausa, artrite reumatoide e periodontite se caracterizam por uma predominância inflamatória nas articulações ou tecidos periodontais. Reposição hormonal, promoção de exercícios físicos, remoção da causa inflamatória e administração de antirreabsortivos, ranelato de estrôncio, vitamina D e análogos do PTH são algumas estratégias utilizadas para o controle das doenças osteolíticas².

As estratégias farmacológicas para o tratamento da osteoporose concentram, sobretudo, no uso de antirreabsortivos que inibem as vias de diferenciação osteoclástica ou que induzem a apoptose dos osteoclastos. Os bisfosfonatos, medicamentos comumente utilizados para o tratamento da osteoporose, possuem alta afinidade com o tecido mineral ósseo e atuam inibindo processos celulares dependentes de ATP, levando à apoptose dos osteoclastos⁵⁴. Outro importante fármaco utilizado no tratamento da osteoporose é o Denosumab, um anticorpo monoclonal humano que tem como alvo o mediador de reabsorção RANKL, inibindo de modo significativo a osteoclastogênese¹².

A utilização desses medicamentos está associada à diversos efeitos colaterais clínicos. O uso prolongado de bisfosfonatos, por exemplo, está relacionado à osteonecrose dos maxilares, condição clínica caracterizada por uma exposição de osso necrótico persistente que não cicatriza por mais de oito semanas, havendo ruptura de tecido mole na cavidade oral, sendo debilitante e doloroso aos pacientes, observada em cerca de 0,01% dos pacientes osteoporóticos tratados com bisfosfonatos^{54,55}. Além disso, foi observado risco aumentado de fraturas vertebrais múltiplas após a descontinuação de Denosumab, em pacientes tratados para osteoporose¹⁰.

Diferentemente, o tratamento da periodontite não é puramente farmacológico. A fim de controlar a inflamação e interromper a progressão da doença, o manejo primário é a remoção mecânica do biofilme através de raspagem e alisamento radicular, de modo cirúrgico ou não, além de orientação de higiene oral e redução dos fatores de risco modificáveis, como tabagismo. Porém, para melhorar o resultado do tratamento e auxiliar em casos complexos, outras estratégias podem servir como adjunto no manejo das doenças periodontais, o que inclui a administração antibiótica local, antibioticoterapia sistêmica e utilização de agentes moduladores da resposta do hospedeiro⁵⁶.

3.4 Catepsina k como alvo terapêutico

Por sua atividade única catalítica e importância no processo de reabsorção óssea, desde 1995 a CTSK tem sido alvo de inúmeros estudos visando o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças osteolíticas, sobretudo a osteoporose. Enquanto os agentes antirreabsortivos em uso atualmente apresentam, além da inibição osteolítica, efeitos inibitórios também no processo de formação óssea, os inibidores de CTSK demonstraram inibir a reabsorção óssea com efeitos menores na atividade osteoblástica¹⁵.

O tratamento com inibidores de CTSK (Relacatib, Balicatib, ONO-5334, Odanacatib) reduziu marcadores séricos e urinários de reabsorção óssea e aumentou a densidade mineral óssea (DMO) em estudos pré-clínicos em primatas. Foi evidenciado, também, que esses inibidores são capazes de diminuir a reabsorção óssea provocada por doenças periodontais e endodônticas em camundongos. Os resultados promissores motivaram a realização de ensaios

clínicos avaliando segurança e eficácia desses fármacos para o tratamento da osteoporose^{15,57,58}.

Dentre os inibidores de CTSK desenvolvidos, apenas o Odanacatib chegou à fase III de ensaios clínicos. Em um estudo randomizado, o tratamento com Odanacatib reduziu a reabsorção óssea, manteve a atividade osteoblástica e aumentou a densidade mineral óssea (DMO) e a resistência óssea no quadril e na coluna^{13,59}. Porém, seu uso foi associado a um aumento de eventos colaterais cerebrovasculares que levou à descontinuação das pesquisas envolvendo o fármaco^{14,60}.

O uso de inibidores de CTSK para o tratamento das doenças osteolíticas permanece promissor. Em contraste com os agentes antirreabsortivos atuais, que têm como alvo o osteoclasto, os inibidores de CTSK podem provocar efeitos também em outros tecidos, já que a enzima não está presente somente nas células ósseas e se envolve em várias outras vias metabólicas e regulatórias. O desafio, então, está em desenvolver inibidores mais específicos, que atuem na atividade osteolítica da CTSK, lançando mão do seu potencial antirreabsortivo e buscando diminuir possíveis efeitos colaterais^{39,61}.

Recentemente, a Tanshinona-IIa-sulfonato (T06) - um derivado solúvel da Tanshinona IIA, componente natural da erva *Salvia miltiorrhiza*, comumente utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças ósseas e cardiovasculares. - foi classificada como um inibidor ectostérico da CTSK. O conceito de inibição ectostérica da protease foi desenvolvido para nominar a inibição de sítios específicos envolvidos no reconhecimento seletivo do substrato ou ligante associado à atividade colagenolítica, sem interferir em outros sítios ativos da protease^{16,62}.

A T06 inibe, de maneira reversível, a reabsorção óssea induzida por RANKL em células humanas e de camundongos, sem interferir na osteoclastogênese. Além disso, em ratas ovariectomizadas, o tratamento com T06 controlou o fenótipo osteoporótico, aumentou a DMO do fêmur e reduziu valores de liberação de fragmento de telopeptídeo C-terminal (CTX), contribuindo para o aumento do número de osteoblastos e na expressão de fosfatase alcalina, o que difere do efeito de inibição osteoblástica dos bisfosfonatos¹⁶. Posteriormente, outros derivados das Tanshinonas também foram classificados como inibidores ectostéricos da CTSK^{63,64},

elucidando o mecanismo de ação da tradicional utilização clínica de extratos da *Salvia miltiorrhiza* na medicina chinesa para o tratamento da osteoporose^{62,65}.

O êxito pré-clínico de inibidores de CTSK convencionais no tratamento de patologias periodontais e endodônticas^{57,58} e o surgimento de compostos ainda mais seletivos para a ação colagenolítica da CTSK abrem caminho para o avanço nas pesquisas sobre o efeito desses inibidores ectostéricos em condições inflamatórias e infecciosas, como possíveis agentes moduladores do hospedeiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos (*Mus musculus*, Swiss) machos de 5-6 semanas foram obtidos do Biotério Central da UFG e mantidos no setor de experimentação animal do FARMATEC – FF – UFG em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22° a 24°C) e luminosidade (12h de ciclo claro). O manejo dos roedores foi regido pelos princípios éticos da experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA UFG – 011/21). Ao todo foram utilizados 6 camundongos.

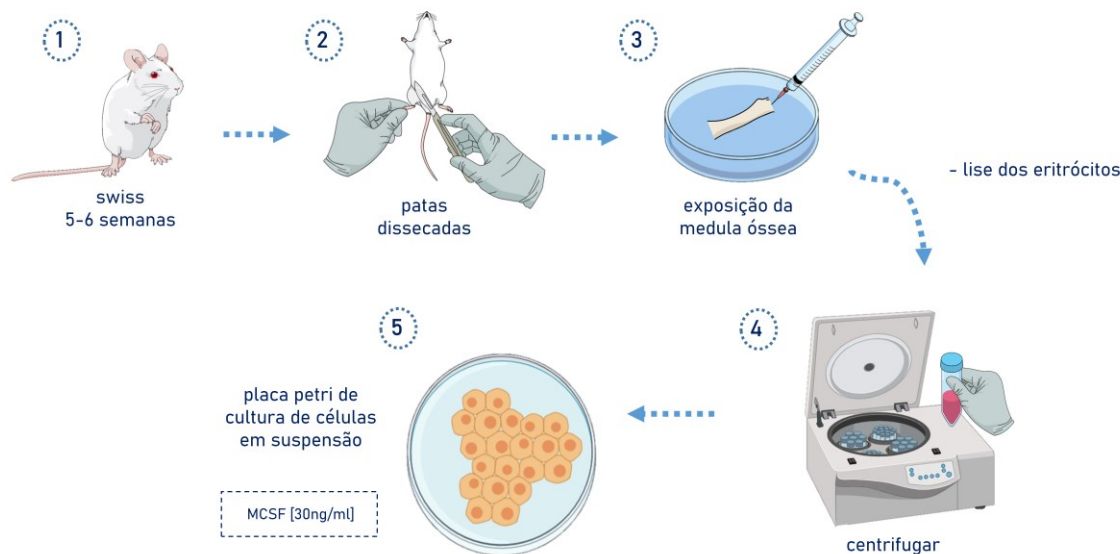
4.2 Isolamento de macrófagos de medula óssea

Para obtenção de macrófagos oriundos de medula óssea (BMMs) (FIG. 3), camundongos de 5-6 semanas foram anestesiados por sobredose de isoflurano (câmara saturada a 10%) e eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação. As patas traseiras foram dissecadas, fêmures e tíbias foram individualizados e tiveram suas epífises cortadas; realizou-se, então, lavagem da porção medular destes ossos com uma seringa contendo 5ml de α -MEM, para expulsar a medula óssea sobre placas de Petri estéreis. O conteúdo resultante da lavagem foi centrifugado à 1.000 rpm por 5min.

Após a centrifugação, o sobrenadante da solução foi descartado e o sedimentado celular no fundo do tubo (pellet) ressuspendido em 4,5ml de água gelada estéril, seguido rapidamente da adição de 500 μ l de PBS 10x. O conteúdo do tubo foi mais uma vez centrifugado à 1.000 rpm por 5min e o pellet ressuspendido e cultivado em α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina (100 μ g/ml) e estreptomicina (100 μ g/ml) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) adicionado de 30ng/ml de M-CSF.

As células foram cultivadas em placas de cultura (Corning®, 430591) aderente para macrófagos e não aderente às células T, B ou do estroma, e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico durante 72h.

Figura 3 - Sequência de eventos para isolamento de macrófagos de medula óssea



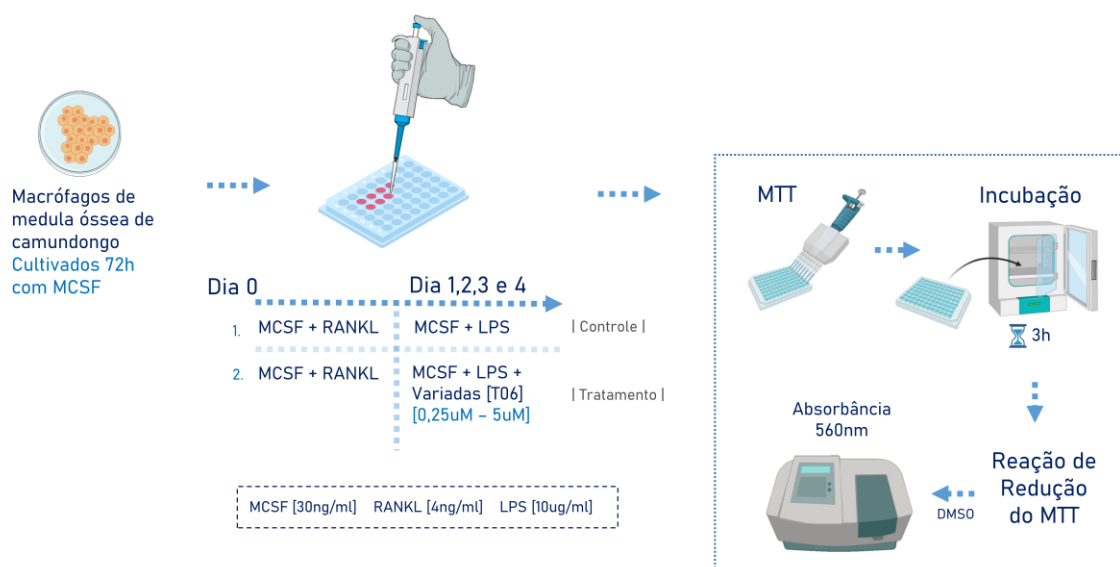
Fonte: Elaboração própria

4.3 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade (FIG. 4) foi realizado utilizando o método de redução do sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)]. BMMs de camundongo foram semeados (5×10^3 células/poço) em 5 μ l de α -MEM / 10% SFB em placas de 96 poços. Após 5 minutos, foram adicionados 100 μ l de α -MEM / 10% SFB acrescentado de M-CSF (30ng/ml) / RANKL (4ng/ml) e incubados por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com M-CSF / *E. coli* LPS (10ug/ml) (L2880 – Sigma-Aldrich) e expostas à variadas concentrações de T06 (Chem Faces, CFS201702) [0,25 - 5 μ M] por 3 dias. Metade do meio foi trocado após 48h de exposição.

No fim do período experimental, as células foram incubadas com meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Após 3 h de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (100 μ L/poço), e a densidade óptica foi medida em um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Spectrum, EUA) a 560 nm. Este ensaio foi realizado em sextuplicata, em três experimentos independentes. A viabilidade celular relativa foi determinada em comparação com o grupo controle - osteoclastos diferenciados com LPS não expostos à T06 - para o estabelecimento de concentração não citotóxica empregada em análises posteriores.

Figura 4 - Etapas envolvidas na análise de citotoxicidade pelo método da redução do MTT



Fonte: Elaboração própria

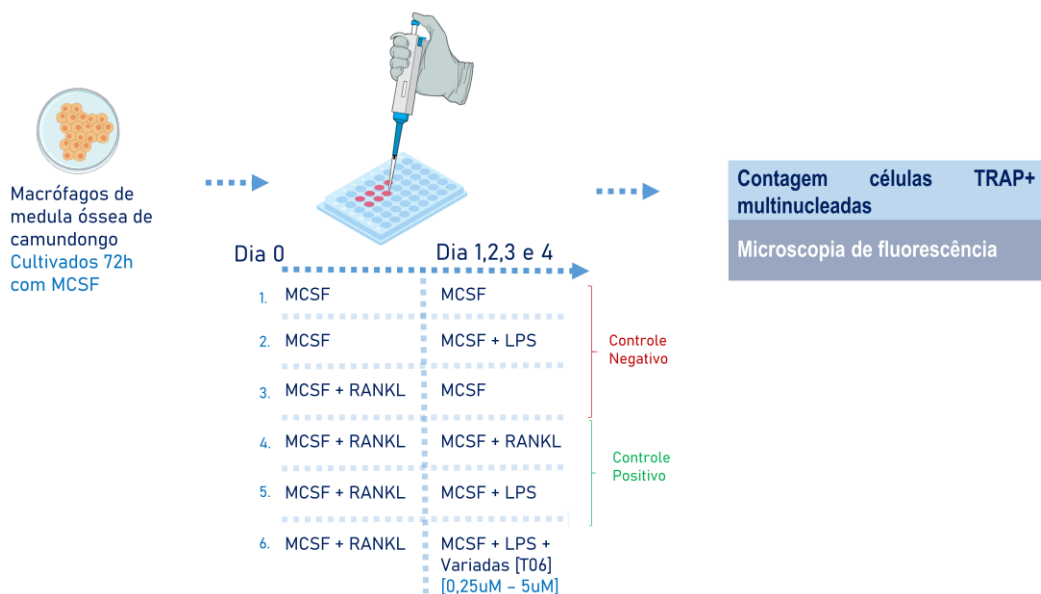
4.4 Ensaio de osteoclastogênese induzida por lipopolissacarídeo

BMMs foram semeados (5×10^3 células/poço) em 5µl de α -MEM em placas de 96 poços (n=4). Após 5 minutos, 100µl de α -MEM acrescentado de M-CSF (30ng/ml) ou M-CSF / RANKL (4ng/ml) foram adicionados às células e incubados por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com M-CSF / RANKL, M-CSF / *E. coli* LPS (10ug/ml) ou M-CSF / LPS / T06 [0,25 - 5µM] por 3 dias (FIG. 5). Metade do meio foi trocado após 48h de exposição.

No fim do período experimental, as células foram fixadas com Paraformaldeído 4% por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS, coradas para TRAP e o número de células multinucleadas TRAP⁺ foi contado.

Os ensaios foram realizados em quadruplicata (n=4) em dois experimentos independentes.

Figura 5 - Ilustração do método: Ensaio de osteoclastogênese induzida por LPS



Fonte: Elaboração própria.

4.5 Ensaio de osteoclastogênese sobre disco de osso

Discos de osso cortical (5,5mm x 0,5mm) (fabricação própria) foram obtidos a partir de fêmures bovinos. Para utilização em cultura celular, os discos foram mantidos em etanol 70% e sonicados por 20 minutos. Logo após, os discos passaram por 3 lavagens com PBS e três lavagens com α -MEM não suplementado. Seguidamente, ocorreu-se a adição de 100 μ l de α -MEM acrescido de M-CSF (30ng/ml) ou M-CSF / RANKL (4ng/ml) sobre os discos.

Macrófagos de medula óssea de camundongo foram semeados sobre os discos preparados (2×10^4 células/disco de osso) em 20 μ l de α -MEM acrescido de M-CSF ou M-CSF / RANKL e incubados por 24h. Posteriormente, as células expostas ao RANKL foram tratadas com M-CSF / RANKL ou M-CSF / *E. coli* LPS na presença ou ausência de T06 [1 μ M] por 9 dias. Metade do meio foi trocado a cada dois dias. Após 9 dias, os osteoclastos foram corados para TRAP e o número de células multinucleadas TRAP+ foi contado.

O ensaio foi realizado em quadruplicata (n=4) em um experimento. Novas repetições serão realizadas para confirmação dos resultados.

4.6 Microscopia de fluorescência

As células resultantes dos ensaios descritos nos tópicos 4.4 e 4.5 foram observadas com microscopia Confocal (TCS SP8 DMI8, Alemanha). O fluorocromo alexa fluor 647 Phalloidin foi excitado com a linha do laser de argônio em 650nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 688nm. O produto gerado pela marcação com Hoechst 33342 foi excitado com a linha do laser Diodo 350 e a intensidade de emissão de fluorescência medida em 461nm. Utilizou-se também a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC- também conhecida como contraste de interferência de Nomarski ou microscopia de Nomarski) para obtenção de imagens das células sem qualquer tipo de marcação.

4.7 Análise da expressão de citocinas inflamatórias

BMMs foram semeados (5×10^3 células/poço) em 5µl de α -MEM em placas de 96 poços (n=4). Após 5 minutos, 100µl de α -MEM acrescentado de M-CSF (30ng/ml) ou M-CSF / RANKL (4ng/ml) foram adicionados às células e incubados por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com M-CSF / RANKL, M-CSF / *E. coli* LPS (10ug/ml) ou M-CSF / LPS / T06 [1µM] por 3 dias. Metade do meio foi trocado após 48h de exposição.

No fim do período experimental, o sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado a -80°C até análise. As concentrações das citocinas interleucina (IL)-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF foram avaliadas pelo ensaio Cytometric Bead Array (CBA), usando o kit de citocinas inflamatórias (BD Bioscience, cat. n.º 552364, San Diego, EUA). A fluorescência foi medida usando citometria de fluxo, onde 2000 eventos foram obtidos usando o software BDFACSDiva™ e analisados usando o FCAP Array™ Software.

O ensaio foi realizado em quadruplicata em um experimento. Novas repetições serão realizadas para confirmação dos resultados.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos a partir de cada experimento foram analisados separadamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os gráficos foram feitos usando médias com desvio padrão e

para as comparações entre grupos foi utilizado o teste One-way ANOVA com Post-hoc Test Tukey. O valor- $p < 0,05$ foi considerado significativamente diferente.

5 RESULTADOS

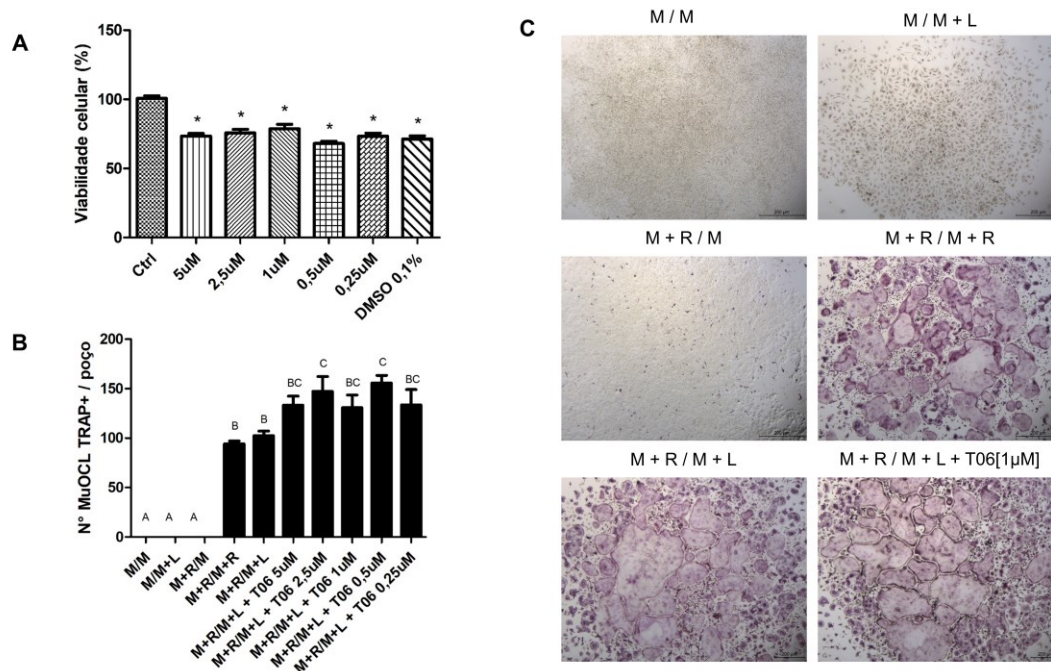
5.1 T06 estimula a osteoclastogênese em cultura de BMMs

A fim de avaliar o efeito da T06 na viabilidade celular e determinar a concentração apropriada a ser empregada em outros ensaios, osteoclastos induzidos por LPS foram expostos à variadas concentrações de T06 [0,25-5 μ M]. Para isso, foi utilizado o método MTT, um ensaio colorimétrico baseado na redução do sal de tetrazólio por células metabolicamente ativas⁶⁶. O tratamento com T06 apresentou sinais de citotoxicidade, de forma independente da dose. A maioria das concentrações testadas, porém, permitiu viabilidade celular superior à 75% (FIG. 6A).

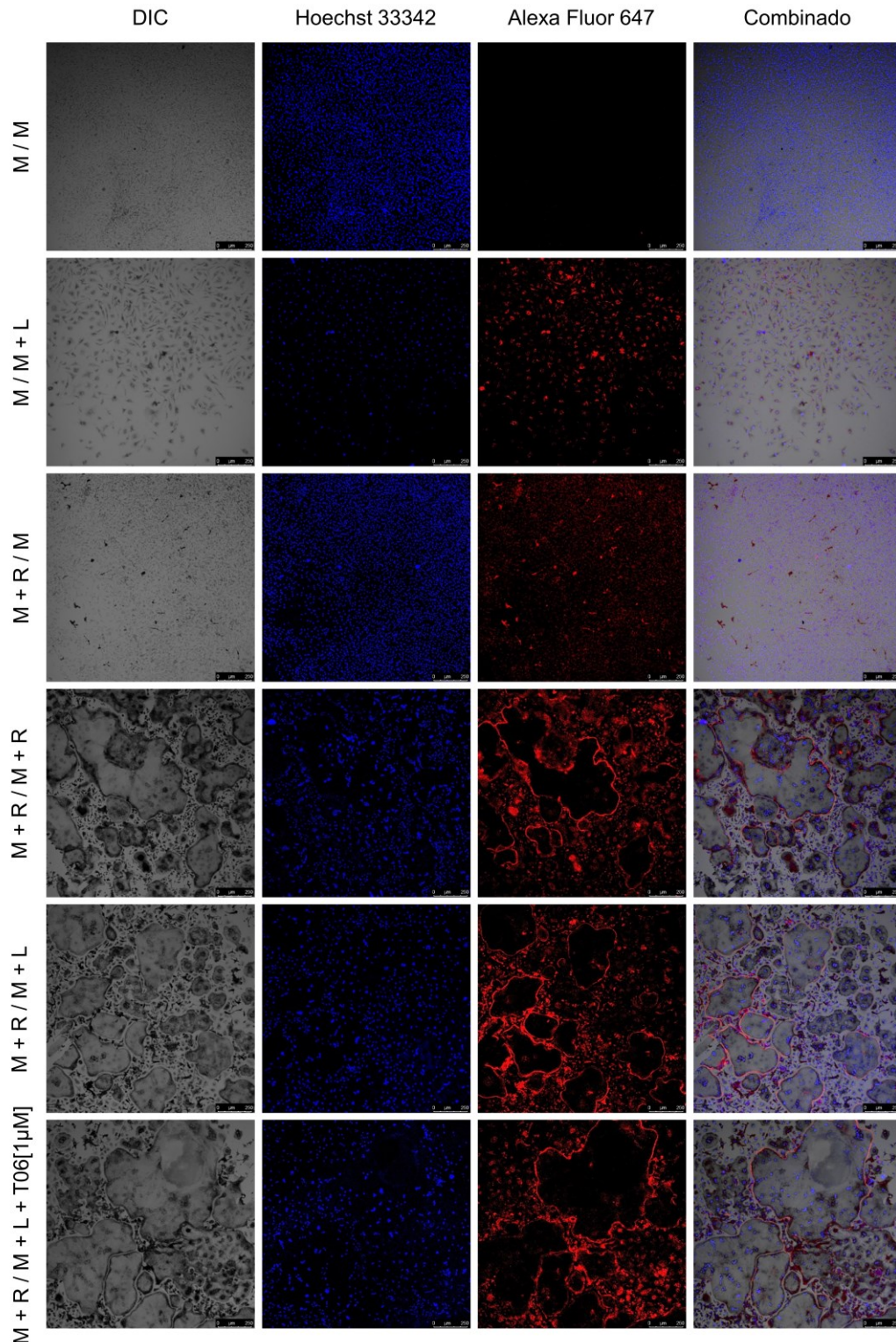
Para explorar o efeito de produtos bacterianos na diferenciação de BMMs em osteoclastos e investigar como exposição a um inibidor ectostérico da CTSK interfere neste processo, utilizamos a marcação da enzima lisossomal TRAP como um identificador osteoclástico. Células marcadas para TRAP com três ou mais núcleos foram consideradas como osteoclastos.

Observamos que BMMs tratadas apenas com M-CSF (M/M) durante todo período experimental não se diferenciaram em osteoclastos. O tratamento com LPS em células não preparadas com RANKL (M/M+L), mesmo sem induzir a diferenciação, resultou em células mononucleares fusiformes ou triangulares positivas para TRAP (FIG. 6C). BMMs tratadas com RANKL apenas no primeiro dia (M+R/M) também não se diferenciaram. Já as células tratadas com RANKL por 24h e, posteriormente, tratadas com RANKL (M+R/M+R) ou LPS (M+R/M+L), se diferenciaram em osteoclastos multinucleados positivos para TRAP (FIG. 6C), deixando evidente a marcação para anéis de actina (FIG. 7).

Houve uma tendência de aumento do número de osteoclastos (células multinucleadas TRAP+) nos grupos tratados com T06, sendo que, as concentrações de 2,5 e 0,5 μ M apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo não tratado (M+R / M+L) (FIG. 6B).

Figura 6 – Efeito da T06 na osteoclastogênese induzida por LPS

BMMs de camundongos foram preparados com M-CSF (M; 30ng/ml) ou M-CSF e RANKL (R; 4ng/ml) por 24h. Em seguida, as células preparadas com M/R foram tratadas com M-CSF, M-CSF e RANKL ou M-CSF e LPS (L; 10 μ g/ml) na ausência ou presença de T06 [0,25-5 μ M] por 3 dias. As células foram coradas para TRAP e observadas em Microscópio óptico (DM300 - Leica Microsystems GmbH) (A). A viabilidade celular foi detectada pelo método MTT (B). Células TRAP+ multinucleadas (três ou mais núcleos) foram contadas (C).

Figura 7 – Osteoclastos tratados com T06 expressam anéis de actina

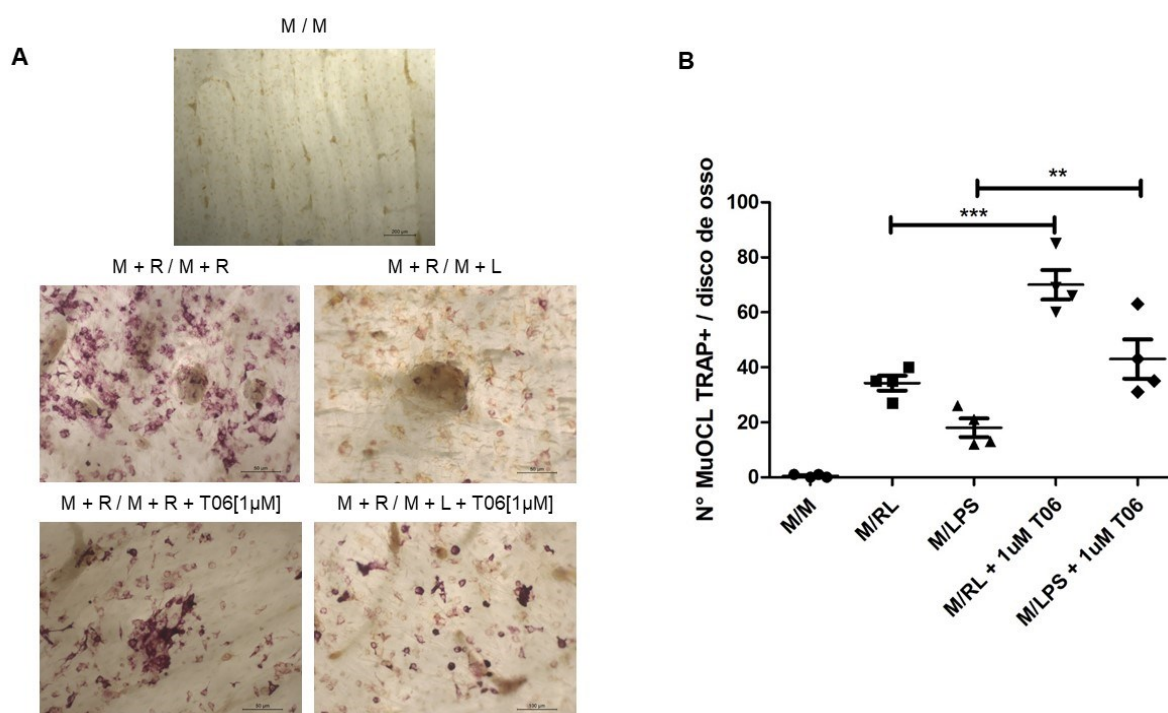
BMMs tratados conforme já descrito (legenda FIG. 6) foram corados com faloidina marcada com AlexaFluor-647 e Hoechst 33342. DIC, imagens sem qualquer tipo de marcação. Em azul, marcação para Hoechst 33342, identificando núcleos; Em vermelho, marcação para AlexaFluor-647, indicando morfologia do citoesqueleto celular. BMMs induzidos por LPS e tratados com T06 expressaram anéis de actina, em vermelho.

5.2 T06 estimula a osteoclastogênese induzida por LPS sobre discos de osso

Para investigar o efeito do tratamento com T06 na osteoclastogênese sobre discos de osso, BMMs cultivadas em meio adicionado de M-CSF foram primadas com RANKL por 24h e tratadas com RANKL ou LPS na ausência ou presença de T06 [1 μ M]. T06 aumentou significativamente ($p<0,05$) o número de células multinucleadas TRAP+ nos grupos estimulados com RANKL e com LPS (FIG. 8).

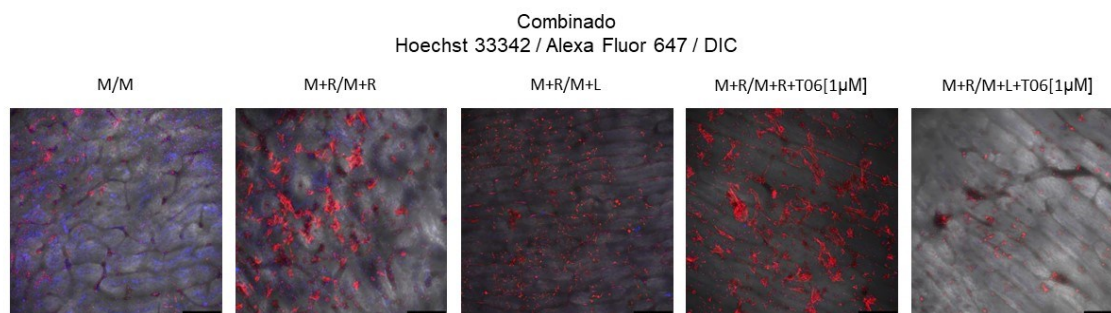
As células tratadas apenas com M-CSF não se diferenciaram em osteoclastos (FIG. 8). Pôde-se observar maior formação de células multinucleadas TRAP+ no grupo estimulado com RANKL, que no grupo estimulado com RANKL/LPS (FIG. 8).

Figura 8 – T06 aumenta a diferenciação osteoclástica sobre discos de osso



BMMs de camundongos cultivados sobre discos de osso bovino foram preparados com M-CSF (M; 30ng/ml) ou M-CSF e RANKL por 24h (R; 4ng/ml). Em seguida, as células preparadas com M-CSF e RANKL foram tratadas com M-CSF e RANKL ou M-CSF e LPS (10 μ g/ml) na ausência ou presença de T06 [1 μ M] por 9 dias. Células coradas para TRAP (A). Células TRAP+ multinucleadas (três ou mais núcleos) foram contadas.

Figura 9 – Cultura de BMMs sobre disco de osso



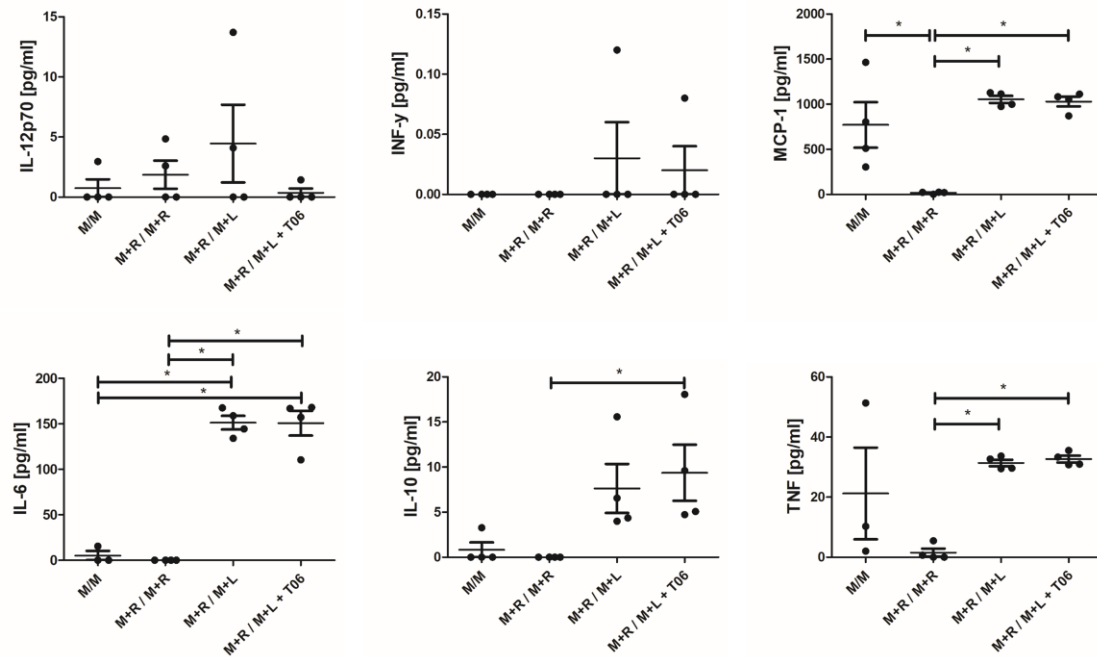
BMMs tratados conforme já descrito (legenda FIG. 8) foram incubados com faloidina marcada com AlexaFluor-647 e Hoechst 33342. Em azul, marcação para Hoechst 33342, identificando núcleos; em vermelho, marcação para AlexaFluor-647, indicando morfologia do citoesqueleto celular.

5.3 T06 não altera a expressão de citocinas inflamatórias

A fim de comparar a expressão de citocinas inflamatórias em osteoclastos induzidos por RANKL e por LPS, e analisar o efeito do tratamento com T06 [1µM] na expressão de citocinas, BMMs foram estimuladas com RANKL ou RANKL + LPS e tratadas com T06. O sobrenadante da cultura foi coletado e as citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF foram avaliadas pelo ensaio CBA.

Em cultura de osteoclastos primados com RANKL por 24h e posteriormente induzidos com LPS, a expressão de MCP-1, IL-6 e TNF foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com osteoclastos induzidos apenas por RANKL. A indução com LPS também modulou positivamente a expressão de IL-10, sendo a diferença estatisticamente significante somente no grupo tratado com T06. Em comparação com a cultura de osteoclastos induzidos por LPS, o tratamento com T06 não modulou a expressão de citocinas inflamatórias. IL-12p70 e INF- γ não foram modulados em nenhum dos grupos testados.

Figura 10 - Expressão de citocinas inflamatórias [pg/ml] em cultura de osteoclastos



Expressão de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p70, INF-γ, MCP-1 e TNF) em sobrenadante coletado da cultura de BMMs tratadas apenas com M-CSF, diferenciadas com RANKL ou RANKL+LPS e tratadas com T06.

6 DISCUSSÃO

É bem conhecido que a disbiose da microbiota oral associada à intensa resposta inflamatória caracteriza parte fundamental da etiopatogenia da periodontite⁵⁶. A ativação de TLRs em osteoclastos e seus precursores é um aspecto importante na patogênese da remodelação óssea induzida por processos inflamatórios. Nesse contexto, nosso trabalho estudou o efeito da T06 na biologia dos osteoclastos através da administração de LPS em macrófagos oriundos de medula óssea de camundongos, um modelo experimental que ativa TLRs e eleva a expressão de citocinas inflamatórias *in vitro*^{67,68}.

Nossos experimentos confirmaram observações anteriores de que LPS (10µg/ml) não induz a osteoclastogênese em BMMs tratados apenas com M-CSF³². Em nosso estudo, porém, essas células tiveram sua morfologia alterada e marcação positiva para TRAP. Já BMMs preparadas com RANKL são induzidos à diferenciação osteoclástica quando estimulados com LPS. Nesse caso, a osteoclastogênese é sustentada mesmo na ausência de RANKL³². Os osteoclastos formados exibiram características morfológicas (multinucleados TRAP+, formação de anéis de actina) normais (FIG. 7).

Citocinas inflamatórias podem ser responsáveis pela manutenção da osteoclastogênese em mecanismos independentes de RANKL. BMMs de camundongos cultivados apenas com M-CSF e TNF-α geram células TRAP+ multinucleadas. TNF-α e IL-1 ativam, sequencialmente, fatores de transcrição osteoclastogênicos, NF-κB, c-Fos e NFATc1^{69,70}. Em cultura de monócitos de sangue periférico humano, o tratamento com IL-6 e M-CSF também induziu a formação de osteoclastos. Em BMMs, porém, a adição de IL-6 suprimiu a osteoclastogênese induzida por RANKL^{3,71,72}. A expressão de MCP-1 também parece ser fundamental para a biologia dos osteoclastos. O tratamento com MCP-1 em cultura de monócitos humanos aumentou o número de osteoclastos induzidos por RANKL e induziu a formação de osteoclastos também de forma independente de RANKL^{73,74}. Aqui, relatamos que osteoclastos induzidos por LPS aumentaram a expressão de TNF, IL-6 e MCP-1. Nossos resultados sustentam que citocinas inflamatórias estão envolvidas na manutenção da osteoclastogênese quando na ausência de RANKL.

O efeito da deficiência de CTSK no metabolismo das células ósseas ainda é conflitante na literatura. Inicialmente, a deleção do gene da CTSK em camundongos resultou em aumento da massa óssea mas sem alterações no número de osteoclastos⁷⁵. Mais tarde, porém, foi relatado alterações apoptóticas e aumento significativo do número de osteoclastos em modelos semelhantes^{46,76}. Já alguns inibidores da CTSK reduziram a osteoclastogênese in vivo e in vitro, inclusive em modelos estimulados por LPS^{58,77}. Por último, inibidores ectostéricos da Ctsk não influenciaram na osteoclastogênese induzida por RANKL^{16,63,64}. Aqui relatamos que T06 modulou positivamente o número de osteoclastos induzidos por LPS em placas de cultura. Sobre discos de osso, o tratamento com T06 aumentou significativamente a osteoclastogênese induzida por RANKL e por LPS. O aumento do número de osteoclastos sugere uma limitação para uso clínico da T06. Como T06 inibe a atividade osteoclástica de modo reversível¹⁶, a descontinuação do fármaco in vivo poderia causar um efeito rebote, aumentando a quantidade de osteoclastos ativos e reabsorção óssea, efeito semelhante ao descrito para o Denosumabe⁷⁸. Obviamente, estudos in vivo utilizando modelos animais de reabsorção óssea inflamatória, como a injeção de LPS em calvária de camundongos ou um modelo de periodontite induzida por ligadura, associados ao tratamento com T06, poderão elucidar essa hipótese.

T06 se difere da Tanshinona IIA pela adição de um grupo sulfato no carbono 16. A modificação na estrutura química para tornar o fármaco solúvel, também alterou parte de sua atividade farmacológica; o receptor purinérgico humano P2X7, por exemplo, é um alvo molecular de T06, mas não de Tanshinona IIA^{79,80}. Foi relatado que Tanshinona IIA inibe a osteoclastogênese induzida por RANKL em células de linhagem RAW 264.7 e suprime a formação de anéis de actina em osteoclastos maduros⁸¹. Em um modelo de cocultura de BMMs e osteoblastos de calvária de camundongos, Tanshinona IIA inibiu a osteoclastogênese e a expressão de RANKL e OPG induzida por LPS⁸². No presente estudo, porém, mostramos que T06 não inibiu a osteoclastogênese induzida por LPS, mantendo intacta a formação de anéis de actina (FIG. 7). Esses resultados sugerem que Tanshinona IIA e T06 atuam por diferentes mecanismos de ação também nas células osteoclásticas.

O uso de derivados da *Salvia miltiorrhiza* na medicina chinesa no tratamento das doenças ósseas é justificado, em parte, por suas propriedades anti-inflamatórias⁸³. Em contraste, o tratamento com Tanshinona IIA inibiu a

osteoclastogênese mas não modulou a expressão de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-15) em macrófagos peritoneais e osteoblastos de camundongos induzidos por LPS⁸². Aqui relatamos que o tratamento com T06 não alterou os níveis de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF) em macrófagos de medula óssea induzidos por LPS, corroborando com achados anteriores referentes ao tratamento com Tanshinona IIA.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até aqui demonstram que T06, um inibidor ectostérico da CTSK, modulou positivamente a osteoclastogênese induzida por LPS em placas de cultura, sendo essa diferença estatisticamente relevante nas concentrações de 2,5 e 0,5 μ M. Em discos de osso bovino, T06 [1 μ M] estimulou significativamente a formação de osteoclastos induzidos por RANKL e por LPS.

A indução da osteoclastogênese por LPS elevou os níveis de citocinas inflamatórias, enquanto o tratamento com T06 não modulou a expressão dessas citocinas.

REFERÊNCIAS*

1. Kim J-M, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim J-H. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. 2020 [cited 2021 Sep 18]; Available from: www.mdpi.com/journal/cells
2. Yao D, Huang L, Ke J, Zhang M, Xiao Q, Zhu X. Bone metabolism regulation: Implications for the treatment of bone diseases. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 Sep;129:110494. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220306879>
3. Souza PPC, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest*. 2013;42(7):555–622.
4. Souza PPC, Lerner UH. Finding a toll on the route: The fate of osteoclast progenitors after toll-like receptor activation. *Front Immunol*. 2019;10(JULY):1–12.
5. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual Modulation of Osteoclast Differentiation by Lipopolysaccharide. 2002.
6. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene Expression of Osteoclast Differentiation Factor Is Induced by Lipopolysaccharide in Mouse Osteoblasts Via Toll-Like Receptors. *J Immunol*. 2001;166(5):3574–9.
7. Zhou CC, Xu RS, Wu ZP, Zhang ZW, Yuan Q, Zou SJ, et al. Osteogenesis, Osteoclastogenesis and their Crosstalk in Lipopolysaccharide-induced Periodontitis in Mice. *Chin J Dent Res* [Internet]. 2021 Apr 23;24(1):33–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33890453>
8. AlQranei MS, Chellaiah MA. Osteoclastogenesis in periodontal diseases: Possible mediators and mechanisms. *J Oral Biosci* [Internet]. 2020 Jun;62(2):123–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1349007920300116>
9. 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* [Internet]. 2018 Dec;33(1):890–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29723068>
10. Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem* [Internet]. 2013 Sep 1;394(9):1163–79. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hsz-2013-0134/html>
11. Brömme D, Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2009 May 24;18(5):585–600. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543780902832661>
12. Stoch SA, Zajic S, Stone J, Miller DL, Van Dyck K, Gutierrez MJ, et al. Effect of the Cathepsin K Inhibitor Odanacatib on Bone Resorption Biomarkers in Healthy Postmenopausal Women: Two Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase I Studies. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 Aug 6;86(2):175–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/clpt.2009.60>
13. Engelke K, Fuerst T, Dardzinski B, Kornak J, Ather S, Genant HK, et al. Odanacatib treatment affects trabecular and cortical bone in the femur of postmenopausal women: results of a two-year placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):30–8.
14. Mullard A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(10):669.

15. 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.
16. 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.
17. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology The Skeleton. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:131–9.
18. Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41(3):182–5.
19. 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):1330-1347.e13.
20. Lerner UH, Kindstedt E, Lundberg P. The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells. *J Clin Periodontol.* 2019;46(S21):33–51.
21. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PSW, Pixley FJ, Wang Y, et al. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev.* 1997;46(1):4–10.
22. Mun SH, Park PSU, Park-Min KH. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp Mol Med [Internet].* 2020;52(8):1239–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-020-0484-z>
23. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(4):795–823.
24. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors. *J Exp Med.* 1999;190(12):1741–54.
25. Mizuno A, Kanno T, Hoshi M, Shibata O, Yano K, Fujise N, et al. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. Vol. 20, *J Bone Miner Metab.* 2002.
26. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi² I, Tan² H-L, Timms³ E, Capparelli² C, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis [Internet]. Vol. 397, *NATURE.* 1999. Available from: www.nature.com
27. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(6):457–75.
28. Cawley KM, Bustamante-Gomez NC, Guha AG, MacLeod RS, Xiong J, Gubrij I, et al. Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts Suppresses Bone Resorption. *Cell Rep [Internet].* 2020 Sep;32(10):108052. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720310378>
29. Tsukasaki M, Asano T, Muro R, Huynh NC-N, Komatsu N, Okamoto K, et al. OPG Production Matters Where It Happened. *Cell Rep [Internet].* 2020 Sep;32(10):108124. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221112472031113X>
30. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y. Stimulation by Toll-Like Receptors Inhibits Osteoclast Differentiation. *J Immunol.* 2002;169(3):1516–23.
31. Zhang P, Liu J, Xu Q, Harber G, Feng X, Michalek SM, et al. TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through differential induction of NFATc1 and NF- κ B. *J Biol Chem [Internet].*

- 2011;286(27):24159–69. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.198085>
32. Liu J, Wang S, Zhang P, Said-Al-Naief N, Michalek SM, Feng X. Molecular Mechanism of the Bifunctional Role of Lipopolysaccharide in Osteoclastogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 May;284(18):12512–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820584081>
 33. Teitelbaum SL, Abu-Amer Y, Ross FP. Molecular mechanisms of bone resorption. *J Cell Biochem*. 1995;59(1):1–10.
 34. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2014;1840(8):2560–70.
 35. Mandelin J, Hukkanen M, Li TF, Korhonen M, Liljeström M, Sillat T, et al. Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone*. 2006;38(6):769–77.
 36. Lotinun S, Ishihara Y, Nagano K, Kiviranta R, Carpentier VT, Neff L, et al. Cathepsin K-deficient osteocytes prevent lactation-induced bone loss and parathyroid hormone suppression. *J Clin Invest*. 2019;129(8):3058–71.
 37. 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.
 38. Bühling F, Röcken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, et al. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol*. 2004;164(6):2203–16.
 39. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, et al. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(June):1–13.
 40. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*. 1999;273(48):32347–52.
 41. Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by Cathepsin K. *BMC Res Notes*. 2015;8(1):1–8.
 42. Kafienah W, Brömme D, Buttler DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J*. 1998;331(3):727–32.
 43. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K: Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* [Internet]. 1996;271(21):12517–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.21.12517>
 44. Xue Y, Cai T, Shi S, Wang W, Zhang Y, Mao T, et al. Clinical and animal research findings in pycnodysostosis and gene mutations of cathepsin K from 1996 to 2011. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2011;6(1):20. Available from: <http://www.ojrd.com/content/6/1/20>
 45. Gentile MA, Soung DY, Horrell C, Samadfam R, Drissi H, Duong LT. Increased fracture callus mineralization and strength in cathepsin K knockout mice. *Bone* [Internet]. 2014;66:72–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.04.032>
 46. Chen W, Yang S, Abe Y, Li M, Wang Y, Shao J, et al. Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2007 Feb 15;16(4):410–23. Available from: <http://academic.oup.com/hmg/article/16/4/410/684700/Novel-pycnodysostosis-mouse-model-uncovers>
 47. Zhao R, He XW, Shi YH, Liu YS, Liu F Di, Hu Y, et al. Cathepsin K Knockout Exacerbates Haemorrhagic Transformation Induced by Recombinant Tissue

- Plasminogen Activator After Focal Cerebral Ischaemia in Mice. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2019;39(6):823–31. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00682-8>
48. Hua Y, Robinson TJ, Cao Y, Shi GP, Ren J, Nair S. Cathepsin K knockout alleviates aging-induced cardiac dysfunction. *Aging Cell*. 2015;14(3):345–51.
 49. Hua Y, Zhang Y, Dolence J, Shi GP, Ren J, Nair S. Cathepsin K knockout mitigates high-fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *Diabetes*. 2013;62(2):498–509.
 50. Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett*. 2006;235(2):159–76.
 51. Brage M, Lie A, Ransjö M, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Abrahamson M, et al. Osteoclastogenesis is decreased by cysteine proteinase inhibitors. *Bone*. 2004;34(3):412–24.
 52. Lerner UH, Grubb A. Human cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, inhibits bone resorption in vitro stimulated by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide of malignancy. *J Bone Miner Res*. 1992;7(4):433–40.
 53. Da Ponte Leguizamón N, de Molon RS, Coletto-Nunes G, Nogueira AVB, Rocha S V., Neo-Justino DM, et al. Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *J Dent Res*. 2021;
 54. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032–45.
 55. Paper AP. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(3):369–76.
 56. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
 57. 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.
 58. 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* [Internet]. 2015 Aug;86(8):972–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2015.140643>
 59. Brixen K, Chapurlat R, Cheung AM, Keaveny TM, Fuerst T, Engelke K, et al. Bone density, turnover, and estimated strength in postmenopausal women treated with odanacatib: A randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):571–80.
 60. Rodríguez AJ, Abrahamsen B. Cardiovascular Safety of Antifracture Medications in Patients With Osteoporosis: A Narrative Review of Evidence From Randomized Studies. *JBMR Plus* [Internet]. 2021 Jul 23;5(7). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm4.10522>
 61. Cai X, Yuan S, Zeng Y, Wang C, Yu N, Ding C. New Trends in Pharmacological Treatments for Osteoarthritis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021;12:645842. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33935742>
 62. 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.
 63. 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* [Internet]. 2018;175(6):902–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29278432>
64. Panwar P, Søre K, Guido RV, Bueno RVC, Delaisse J-M, Brömme D. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Jan;173(2):396–410. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13383>
 65. Liu Y, Liu JP, Xia Y. Chinese herbal medicines for treating osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2014 Mar 6;(3). Available from: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD005467.pub2>
 66. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
 67. AlQranei MS, Senbanjo LT, Aljohani H, Hamza T, Chellaiah MA. Lipopolysaccharide- TLR-4 Axis regulates Osteoclastogenesis independent of RANKL/RANK signaling. *BMC Immunol* [Internet]. 2021 Dec 25;22(1):23. Available from: <https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-021-00409-9>
 68. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual Modulation of Osteoclast Differentiation by Lipopolysaccharide. Vol. 17, *J Bone Miner Res*. 2002.
 69. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Jan 17;191(2):275–86. Available from: [https://rupress.org/jem/article/191/2/275/51000/Tumor-Necrosis-Factor- \$\alpha\$ -Stimulates-Osteoclast](https://rupress.org/jem/article/191/2/275/51000/Tumor-Necrosis-Factor-α-Stimulates-Osteoclast)
 70. Yao Z, Getting SJ, Locke IC. Regulation of TNF-Induced Osteoclast Differentiation. *Cells* [Internet]. 2021 Dec 31;11(1):132. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/1/132>
 71. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 Directly Inhibits Osteoclast Differentiation by Suppressing Receptor Activator of NF- κ B Signaling Pathways. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Apr;283(17):11535–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820619482>
 72. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou N. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* [Internet]. 2003 Jan;32(1):1–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328202009158>
 73. McDonald MM, Kim AS, Mulholland BS, Rauner M. New Insights Into Osteoclast Biology. *JBMR Plus* [Internet]. 2021 Sep 30;5(9). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm4.10539>
 74. Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 Is Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Promotes Human Osteoclast Fusion, and Rescues Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Suppression of Osteoclast Formation. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr;280(16):16163–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820692961>
 75. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, et al. Cathepsin K Knockout Mice Develop Osteopetrosis Due to a Deficit in Matrix Degradation but Not Demineralization. *J Bone Miner Res* [Internet]. 1999 Oct

- 1;14(10):1654–63. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.1999.14.10.1654>
76. Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhlaoibh R, Risteli J, Laitala-Leinonen T, et al. Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. *Bone* [Internet]. 2005 Jan;36(1):159–72. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328204003813>
 77. Strålberg 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* [Internet]. 2017 May;101(5):1233–43. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3A1016-433R>
 78. Elbers LPB, Raterman HG, Lems WF. Bone Mineral Density Loss and Fracture Risk After Discontinuation of Anti-osteoporotic Drug Treatment: A Narrative Review. *Drugs* [Internet]. 2021 Sep 15;81(14):1645–55. Available from:
<https://link.springer.com/10.1007/s40265-021-01587-x>
 79. Zhou Z-Y, Zhao W-R, Zhang J, Chen X-L, Tang J-Y. Sodium tanshinone IIA sulfonate: A review of pharmacological activity and pharmacokinetics. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Oct;118:109362. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332219322413>
 80. Kaiser M, Sobottka H, Fischer W, Schaefer M, Nörenberg W. Tanshinone II A Sulfonate, but Not Tanshinone II A, Acts as Potent Negative Allosteric Modulator of the Human Purinergic Receptor P2X7. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2014 Sep;350(3):531–42. Available from:
<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.114.214569>
 81. Cheng L, Zhou S, Zhao Y, Sun Y, Xu Z, Yuan B, et al. Tanshinone IIA attenuates osteoclastogenesis in ovariectomized mice by inactivating NF- κ B and Akt signaling pathways. *Am J Transl Res* [Internet]. 2018;10(5):1457–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29887959>
 82. Kwak HB, Sun H-M, Ha H, Kim H-N, Lee J-H, Kim H-H, et al. Tanshinone IIA suppresses inflammatory bone loss by inhibiting the synthesis of prostaglandin E2 in osteoblasts. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2008 Dec;601(1–3):30–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299908010674>
 83. Ekeuku SO, Pang K-L, Chin K-Y. The Skeletal Effects of Tanshinones: A Review. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 16;26(8):2319. Available from:
<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2319>

* 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>

APÊNDICE A – ARTIGO REDIGIDO PARA PUBLICAÇÃO

Efeito da Tanshinona-IIa-sulfonato, um inibidor ectostérico da catepsina k, na osteoclastogênese induzida por LPS

VASCONCELOS VHF^{1,2}, SOUZA PPC^{1,2}

Effect of Tanshinone-IIa-sulfonate, an ectosteric cathepsin k inhibitor, on LPS-induced osteoclastogenesis

VASCONCELOS VHF^{1,2}, SOUZA PPC^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Araraquara, Brasil

²Laboratório de Inovação em Biomateriais (iBioM), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

RESUMO

A Tanshinona-IIa-sulfonato (T06) é um derivado da Tanshinona IIA, substância natural da *Salvia miltiorrhiza* (Danshen). Tais compostos são capazes de inibir especificamente a atividade colagenolítica da Catepsina K, sem interferir na osteoclastogênese induzida por RANKL. Entretanto, ainda não foi investigado o efeito da T06 sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS). O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da T06 sobre a osteoclastogênese induzida por LPS *in vitro*. Para isso, macrófagos foram obtidos de medula óssea (BMMs) de camundongos e a viabilidade avaliada após exposição à variadas concentrações de tanshinona [0,25-5µM], utilizando o ensaio de redução do MTT. As células foram estimuladas à diferenciação com MCSF, RANKL e/ou LPS na presença ou ausência de T06 por 4 dias, em placa de 96 poços. As células foram fotografadas em microscopia de campo claro, para contagem de células TRAP+, e de fluorescência, para visualização dos anéis de actina. O sobrenadante da cultura foi coletado para quantificação de citocinas inflamatórias. T06 modulou positivamente a osteoclastogênese induzida por LPS em placas de cultura, sendo esse resultado estatisticamente relevante ($p < 0,05$) nas concentrações [2,5 e 0,5µM]. A indução da osteoclastogênese com LPS aumentou os níveis de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6 e MCP-1), enquanto o tratamento com T06 não interferiu nesse mecanismo.

Descritores: Osteoclastos; catepsina k; lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

Tanshinone-IIa-sulfonate (T06) is a derivative of Tanshinone IIA, a natural substance from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen). Such compounds are able to specifically inhibit the collagenolytic activity of Cathepsin K, without interfering with RANKL-induced osteoclastogenesis. However, the effect of T06 on lipopolysaccharide (LPS)-induced osteoclast differentiation and activity has not yet been investigated. The aim of the present work was to investigate the effect of T06 on LPS-induced osteoclastogenesis in vitro. To this end, macrophages were obtained from mouse bone marrow (BMMs) and viability assessed after exposure to varying concentrations of tanshinone [0.25-5 μ M] using the MTT reduction assay. Cells were stimulated to differentiation with MCSF, RANKL and/or LPS in the presence or absence of T06 for 4 days in a 96-well plate. Cells were photographed under brightfield microscopy, for counting TRAP⁺ cells, and fluorescence microscopy, for visualizing actin rings. The culture supernatant was collected for quantification of inflammatory cytokines. T06 positively modulated LPS-induced osteoclastogenesis in culture plates, and this result was statistically relevant ($p < 0.05$) at concentrations [2.5 and 0.5 μ M]. Induction of osteoclastogenesis with LPS increased the levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-6 and MCP-1), while treatment with T06 did not interfere with this mechanism.

Keywords: Osteoclasts; cathepsin k; lipopolysaccharides

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado altamente vascular, adaptado para suportar o corpo e prover alavancagem para os movimentos. A homeostase óssea é preservada a partir da comunicação e ação conjunta das células que compõem o tecido ósseo. Osteoclastos, células que degradam osso a partir da secreção de ácido e enzimas proteolíticas, como a catapsina k (CTSK), e osteoblastos, células formadoras de osso responsáveis pela produção de proteínas extracelulares como osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I, atuam de forma ordenada renovando o tecido e preservando a massa óssea¹. Em certas condições patológicas, porém, as ações dessas células são desacopladas, geralmente resultando em perda de estrutura orgânica e mineral. O fenótipo osteolítico observado na osteoporose, artrite reumatoide e periodontite, por exemplo, é, na maior parte das vezes, decorrente da hiperativação e/ou atividade dos osteoclastos².

A via RANK/RANKL/OPG regula a diferenciação osteoclástica. As células precursoras hematopoiéticas aumentam a expressão do receptor ativador de NF- κ B (RANK) quando expostas ao fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). A ligação de RANK ao seu ligante, RANKL, induz a diferenciação dos precursores de osteoclastos em células da linhagem osteoclástica e, finalmente, a fusão das células mononucleares, gerando células multinucleadas capazes de reabsorver osso, os osteoclastos propriamente ditos. Osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína ubiquamente secretada pertencente à família do fator de necrose tumoral, que se liga a RANKL. A ligação OPG/RANKL impede a ligação RANK/RANKL e inibe a osteoclastogênese³.

Além da via canônica dependente de M-CSF e RANKL, produtos bacterianos também modulam a diferenciação osteoclástica *in vitro* e *in vivo*⁴. O lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa das bactérias, é capaz de inibir ou estimular a osteoclastogênese, a depender do estágio de diferenciação das células precursoras de osteoclastos. LPS de *E. coli*, por exemplo, se liga aos receptores Tipo Toll (TLR) e induz a expressão de fatores de transcrição importantes para a osteoclastogênese, como NF- κ B e MAPK. Além disso, LPS de *P. gingivalis* ativa receptores TLR2 em osteoblastos, aumentando a produção de RANKL^{5,6}. Nesse contexto, modelos de osteoclastogênese induzida por componentes bacterianos mimetizam alguns dos mecanismos envolvidos em doenças osteolíticas inflamatórias associadas à presença de biofilme, como na periodontite^{7,8}.

CTSK é uma protease lisossomal expressa por várias células que tem como alvo catalítico o aminoácido cisteína. Fundamental na homeostase óssea, CTSK liberada por osteoclastos age no processo de degradação da matriz óssea desmineralizada, através da degradação de fibras colágenas e ativação de outras enzimas catalíticas^{9,10}. Sabe-se que a supressão de CTSK pode prevenir a reabsorção óssea sem prejudicar processos osteogênicos. Por conta disso, a indústria farmacêutica tem desenvolvido inibidores direcionados à CTSK para o tratamento das doenças osteolíticas¹¹. O Odanacatib, inibidor mais promissor até o momento, foi testado in vitro, em modelos animais e em humanos, chegando à fase III de ensaios clínicos^{12,13}. O estudo foi encerrado devido a um aumento imprevisto de eventos cerebrovasculares, mas a eficácia do Odanacatib na prevenção de fraturas deu contornos promissores à essa classe de fármacos^{14,15}.

Recentemente, Tanshinona-IIA-sulfonato (T06), um derivado solúvel da Tanshinona IIA, componente abundante da *Salvia mitiorrhiza*, planta amplamente utilizada na medicina chinesa, se mostrou capaz de inibir seletivamente a atividade colagenolítica da CTSK, sem interferir em outros sítios ativos da enzima. O tratamento com T06 diminuiu a reabsorção óssea induzida por RANKL em osteoclastos humanos e de camundongos in vitro e reduziu o fenótipo osteoporótico em ratas ovariectomizadas. A capacidade de prevenir a reabsorção óssea sem interferir na atividade dos osteoblastos, um diferencial dos inibidores de CTSK, associada ao efeito seletivo observado no tratamento com T06 fornece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de antirreabsortivos específicos, com baixa associação à efeitos colaterais¹⁶. Não se sabe, porém, o efeito desse composto em um modelo de osteoclastogênese induzido por componentes bacterianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Camundongos (*Mus musculus*, *Swiss*) machos de 5-6 semanas foram obtidos do Biotério Central da UFG e mantidos no setor de experimentação animal do FARMATEC – FF – UFG em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22° a 24°C) e luminosidade (12h de ciclo claro). O manejo dos roedores foi regido pelos princípios éticos da experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA UFG – 011/21). Ao todo foram utilizados 6 camundongos.

Isolamento de macrófagos de medula óssea

Para obtenção de macrófagos oriundos de medula óssea (BMMs), camundongos de 5-6 semanas foram anestesiados por sobredose de isoflurano (câmara saturada a 10%) e eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação. As patas traseiras foram dissecadas, fêmures e tíbias foram individualizados e tiveram suas epífises cortadas; realizou-se, então, lavagem da porção medular destes ossos com uma seringa contendo 5ml de α -MEM, para expulsar a medula óssea sobre placas de Petri estéreis. O conteúdo resultante da lavagem foi centrifugado à 1.000 rpm por 5min.

Após a centrifugação, o sobrenadante da solução foi descartado e o sedimentado celular no fundo do tubo (pellet) ressuspensionado em 4,5ml de água gelada estéril, seguido rapidamente da adição de 500 μ l de PBS 10x. O conteúdo do tubo foi mais uma vez centrifugado à 1.000 rpm por 5min e o pellet ressuspensionado e cultivado em α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina (100 μ g/ml) e estreptomicina (100 μ g/ml) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) adicionado de 30ng/ml de M-CSF.

As células foram cultivadas em placas de cultura (Corning®, 430591) aderente para macrófagos e não aderente às células T, B ou do estroma, e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico durante 72h.

Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando o método de redução do sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)]. BMMs de camundongo foram semeados (5×10^3 células/poço) em 5µl de α -MEM / 10% SFB em placas de 96 poços. Após 5 minutos, foram adicionados 100µl de α -MEM / 10% SFB acrescido de M-CSF (30ng/ml) / RANKL (4ng/ml) e incubados por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com M-CSF / *E. coli* LPS (10ug/ml) (L2880 – Sigma-Aldrich) e expostas à variadas concentrações de T06 (Chem Faces, CFS201702) [0,25 - 5µM] por 3 dias. Metade do meio foi trocado após 48h de exposição.

No fim do período experimental, as células foram incubadas com meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Após 3 h de incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (100 µL / poço), e a densidade óptica foi medida em um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan Spectrum, EUA) a 560 nm. Este ensaio foi realizado em sextuplicata, em três experimentos independentes. A viabilidade celular relativa foi determinada em comparação com o grupo controle - osteoclastos diferenciados com LPS não expostos à T06 - para o estabelecimento de concentração não citotóxica empregada em análises posteriores.

Ensaio de osteoclastogênese induzida por lipopolissacarídeo

BMMs foram semeados (5×10^3 células/poço) em 5µl de α -MEM em placas de 96 poços (n=4). Após 5 minutos, 100µl de α -MEM acrescido de M-CSF (30ng/ml) ou M-CSF / RANKL (4ng/ml) foram adicionados às células e incubados por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com M-CSF / RANKL, M-CSF / *E. coli* LPS (10ug/ml) ou M-CSF / LPS / T06 [0,25 - 5µM] por 3 dias. Metade do meio foi trocado após 48h de exposição.

No fim do período experimental, as células foram fixadas com Paraformaldeído 4% e coradas para TRAP. O número de células multinucleadas TRAP⁺ foi contado.

Os ensaios foram realizados em quadriplicata (n=4) em dois experimentos independentes.

Microscopia de fluorescência

As células foram observadas com microscopia Confocal (TCS SP8 DMI8, Alemanha). O fluorocromo alexa fluor 647 Phalloidin foi excitado com a linha do laser de argônio em 650

nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 688 nm. O produto gerado pela marcação com Hoechst 33342 foi excitado com a linha do laser Diodo 350 e a intensidade de emissão de fluorescência medida em 461 nm. Utilizou-se também a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC- também conhecida como contraste de interferência de Nomarski ou microscopia de Nomarski) para obtenção de imagens das células sem qualquer tipo de marcação.

Análise da expressão de citocinas inflamatórias

BMMs foram semeados (5×10^3 células/poço) em 5µl de α -MEM em placas de 96 poços (n=4). Após 5 minutos, 100µl de α -MEM acrescentado de M-CSF (30ng/ml) ou M-CSF / RANKL (4ng/ml) foram adicionados às células e incubados por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com M-CSF / RANKL, M-CSF / *E. coli* LPS (10ug/ml) ou M-CSF / LPS / T06 [1µM] por 3 dias. Metade do meio foi trocado após 48h de exposição.

No fim do período experimental, o sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado a -80°C até análise. As concentrações das citocinas interleucina (IL)-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF foram avaliadas pelo ensaio Cytometric Bead Array (CBA), usando o kit de citocinas inflamatórias (BD Bioscience, cat. n.º 552364, San Diego, EUA). A fluorescência foi medida usando citometria de fluxo, onde 2000 eventos foram obtidos usando o software BDFACSDiva™ e analisados usando o FCAP Array™ Software.

O ensaio foi realizado em quadriplicata em um experimento. Novas repetições serão realizadas para confirmação dos resultados.

Análise estatística

Os dados obtidos a partir de cada experimento foram analisados separadamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os gráficos foram feitos usando médias com desvio padrão e para as comparações entre grupos foi utilizado o teste One-way ANOVA com Post-hoc Test Tukey. O valor-p < 0,05 foi considerado significativamente diferente.

RESULTADOS

T06 estimula a osteoclastogênese em cultura de BMMs

A fim de avaliar o efeito da T06 na viabilidade celular e determinar a concentração apropriada a ser empregada em outros ensaios, osteoclastos induzidos por LPS foram expostos à variadas concentrações de T06 [0,25-5 μ M]. Para isso, foi utilizado o método MTT, um ensaio colorimétrico baseado na redução do sal de tetrazólio por células metabolicamente ativas¹⁷. O tratamento com T06 apresentou sinais de citotoxicidade, de forma independente da dose. A maioria das concentrações testadas, porém, permitiu viabilidade celular superior à 75% (FIG. 1A).

Para explorar o efeito de produtos bacterianos na diferenciação de BMMs em osteoclastos e investigar como exposição a um inibidor ectostérico da CTSK interfere neste processo, utilizamos a marcação da enzima lisossomal TRAP como um identificador osteoclástico. Células marcadas para TRAP com três ou mais núcleos foram consideradas como osteoclastos.

Observamos que BMMs tratadas apenas com M-CSF (M / M) durante todo período experimental não se diferenciaram em osteoclastos. O tratamento com LPS em células não pré-expostas a RANKL (M / M+L), mesmo sem induzir a diferenciação, resultou em células mononucleares fusiformes ou triangulares positivas para TRAP (FIG. 1C). BMMs tratadas com RANKL apenas no primeiro dia (M+R / M) também não se diferenciaram. Já as células tratadas com RANKL por 24h e, posteriormente, tratadas com RANKL (M+R / M+R) ou LPS (M+R / M+L), se diferenciaram em osteoclastos multinucleados positivos para TRAP (FIG. 1C), deixando evidente a marcação para anéis de actina (FIG. 2).

Houve uma tendência de aumento do número de osteoclastos (células multinucleadas TRAP+) nos grupos tratados com T06, sendo que, as concentrações de 2,5 e 0,5 μ M apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo não tratado (M+R / M+L) (FIG. 1B).

Figura 1 - Efeito da T06 na osteoclastogênese induzida por LPS

BMMs de camundongos foram preparados com M-CSF (M; 30ng/ml) ou M-CSF e RANKL (R; 4ng/ml) por 24h. Em seguida, as células preparadas com M/R foram tratadas com M-CSF, M-CSF e RANKL ou M-CSF e LPS (L; 10μg/ml) na ausência ou presença de T06 [0,25-5μM] por 3 dias. As células foram coradas para TRAP e observadas em Microscópio óptico (DM300 - Leica Microsystems GmbH) (A). A viabilidade celular foi detectada pelo método MTT (B). Células TRAP+ multinucleadas (três ou mais núcleos) foram contadas (C).

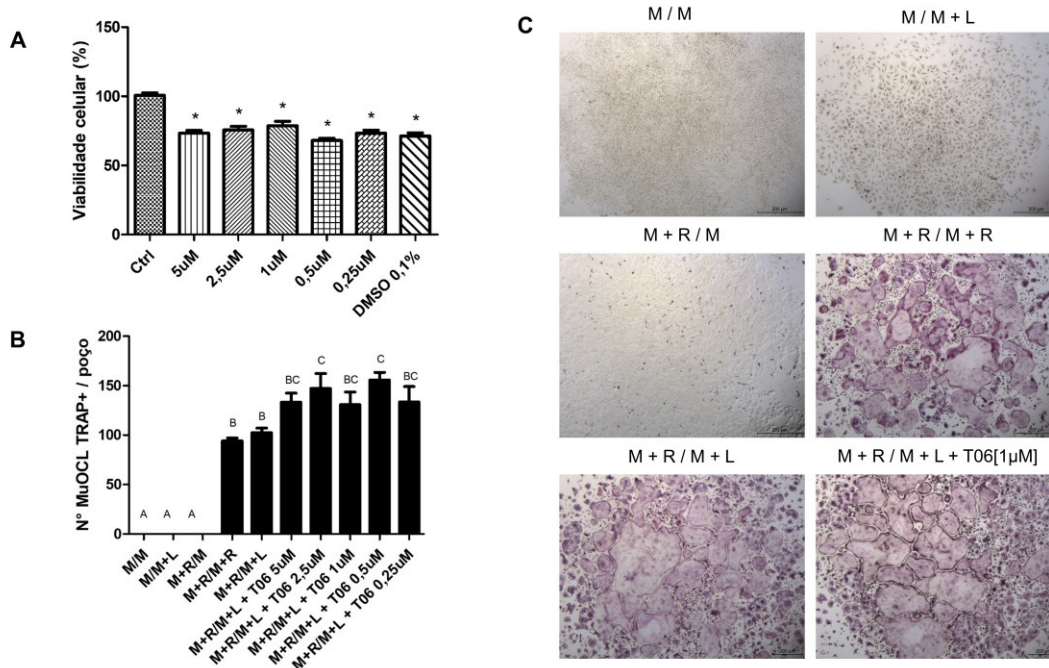
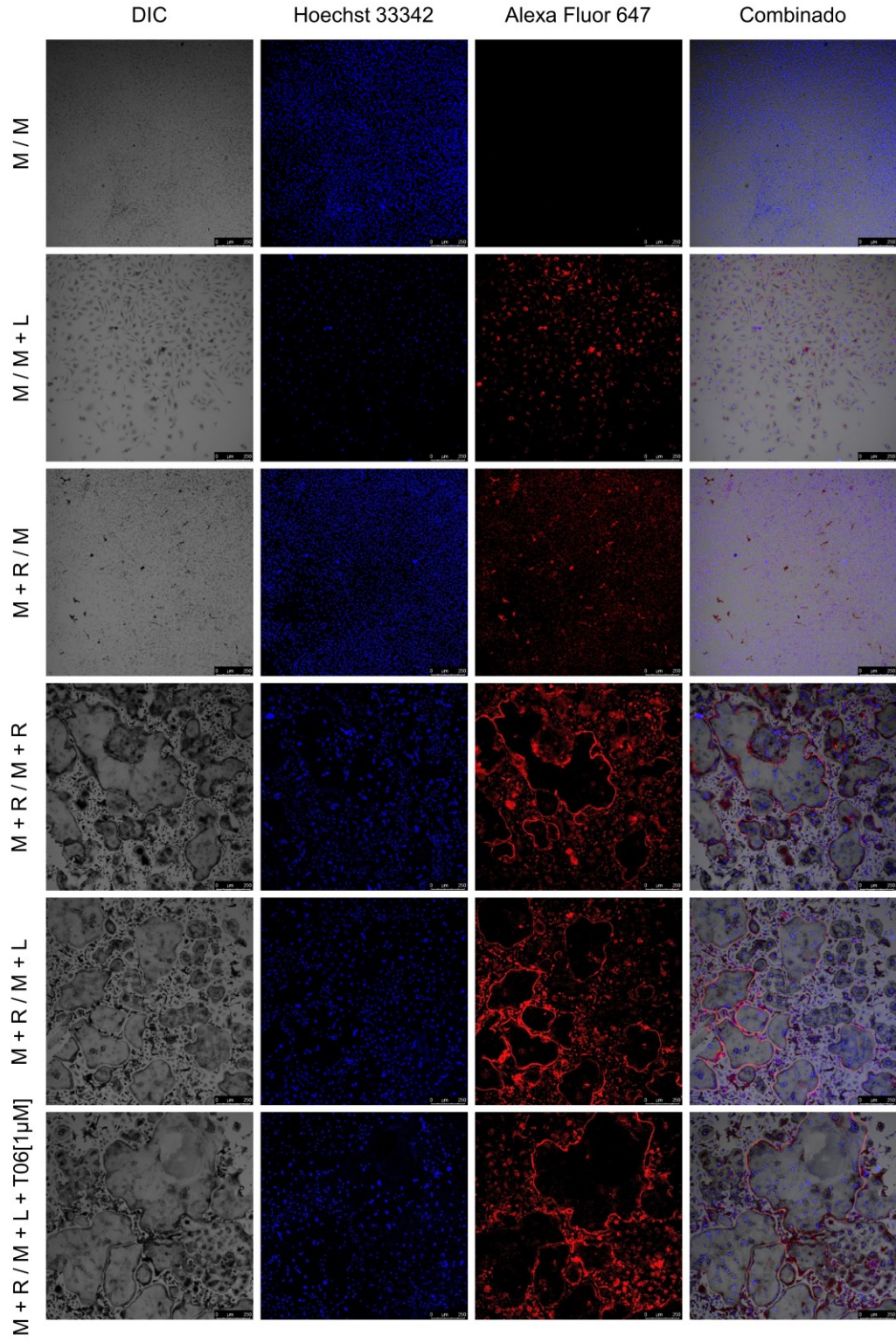


Figura 2 – Osteoclastos tratados com T06 expressam anéis de actina

BMMs tratados conforme já descrito (legenda FIG. 1) foram corados com faloidina marcada com AlexaFluor-647 e Hoechst 33342. DIC, imagens sem qualquer tipo de marcação. Em azul, marcação para Hoechst 33342,

identificando núcleos; Em vermelho, marcação para AlexaFluor-647, indicando morfologia do citoesqueleto celular. BMMs induzidos por LPS e tratados com T06 expressaram anéis de actina, em vermelho.



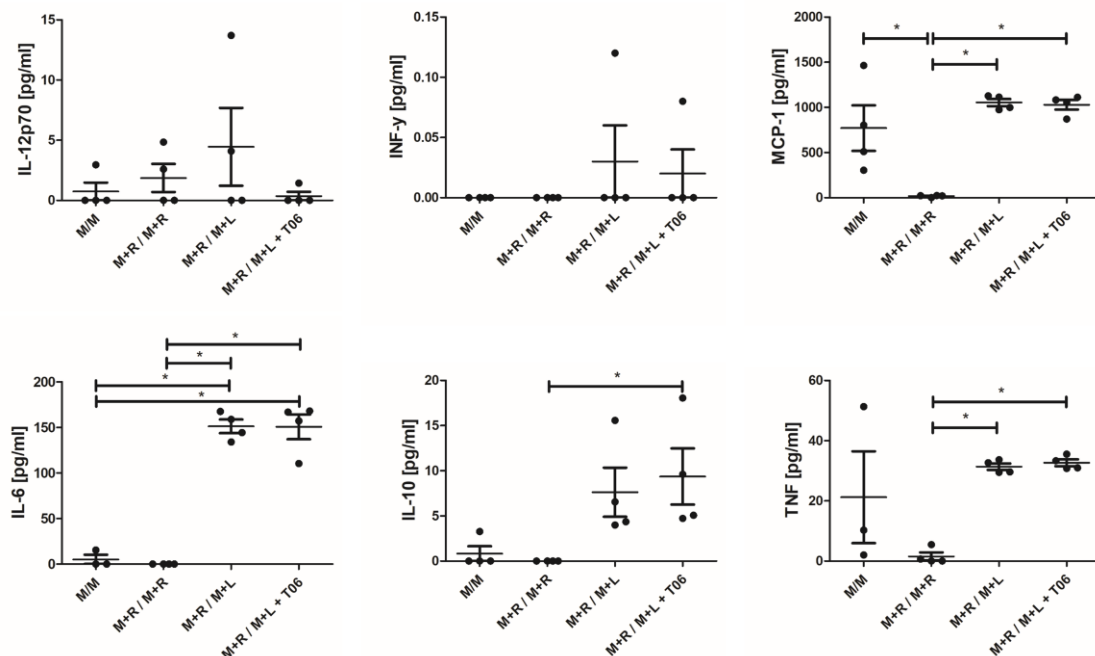
T06 não altera a expressão de citocinas inflamatórias

A fim de comparar a expressão de citocinas inflamatórias em osteoclastos induzidos por RANKL e por LPS, e analisar o efeito do tratamento com T06 [1 μ M] na expressão de citocinas, BMMs foram estimuladas com RANKL ou RANKL + LPS e tratadas com T06. O sobrenadante da cultura foi coletado e as citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF foram avaliadas pelo ensaio CBA.

Em cultura de osteoclastos primados com RANKL por 24h e posteriormente induzidos com LPS, a expressão de MCP-1, IL-6 e TNF foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com osteoclastos induzidos apenas por RANKL. A indução com LPS também modulou positivamente a expressão de IL-10, sendo a diferença estatisticamente significativa somente no grupo tratado com T06. Em comparação com a cultura de osteoclastos induzidos por LPS, o tratamento com T06 não modulou a expressão de citocinas inflamatórias. IL-12p70 e INF- γ não foram modulados em nenhum dos grupos testados (FIG. 3).

Figura 3 - Expressão de citocinas inflamatórias [pg/ml] em cultura de osteoclastos

Expressão de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF) em sobrenadante coletado da cultura de BMMs tratadas apenas com M-CSF, diferenciadas com RANKL ou RANKL+LPS e tratadas com T06.



DISCUSSÃO

É bem conhecido que a disbiose da microbiota oral associada à intensa resposta inflamatória caracteriza parte fundamental da etiopatogenia da periodontite¹⁸. A ativação de TLRs em osteoclastos e seus precursores é um aspecto importante na patogênese da remodelação óssea induzida por processos inflamatórios. Nesse contexto, nosso trabalho estudou o efeito da T06 na biologia dos osteoclastos através da administração de LPS em macrófagos oriundos de medula óssea de camundongos, um modelo experimental que ativa TLRs e eleva a expressão de citocinas inflamatórias *in vitro*^{19,20}.

Nossos experimentos confirmaram observações anteriores de que LPS (10µg/ml) não induz a osteoclastogênese em BMMs tratados apenas com M-CSF²¹. Em nosso estudo, porém, essas células tiveram sua morfologia alterada e marcação positiva para TRAP. Já BMMs preparadas com RANKL são induzidos à diferenciação osteoclástica quando estimulados com LPS. Nesse caso, a osteoclastogênese é sustentada mesmo na ausência de RANKL²¹. Os osteoclastos formados exibiram características morfológicas (multinucleados TRAP+, formação de anéis de actina) normais (FIG. 2).

Citocinas inflamatórias podem ser responsáveis pela manutenção da osteoclastogênese em mecanismos independentes de RANKL. BMMs de camundongos cultivados apenas com M-CSF e TNF- α geram células TRAP+ multinucleadas. TNF- α e IL-1 ativam, sequencialmente, fatores de transcrição osteoclastogênicos, NF- κ B, c-Fos e NFATc1^{22,23}. Em cultura de monócitos de sangue periférico humano, o tratamento com IL-6 e M-CSF também induziu a formação de osteoclastos. Em BMMs, porém, a adição de IL-6 suprimiu a osteoclastogênese induzida por RANKL^{3,24,25}. A expressão de MCP-1 também parece ser fundamental para a biologia dos osteoclastos. O tratamento com MCP-1 em cultura de monócitos humanos aumentou o número de osteoclastos induzidos por RANKL e induziu a formação de osteoclastos também de forma independente de RANKL^{26,27}. Aqui, relatamos que osteoclastos induzidos por LPS aumentaram a expressão de TNF, IL-6 e MCP-1. Nossos resultados sustentam que citocinas inflamatórias estão envolvidas na manutenção da osteoclastogênese quando na ausência de RANKL.

O efeito da deficiência de CTSK no metabolismo das células ósseas ainda é conflitante na literatura. Inicialmente, a deleção do gene da CTSK em camundongos resultou em aumento da massa óssea mas sem alterações no número de osteoclastos²⁸. Mais tarde, porém, foi relatado alterações apoptóticas e aumento significativo do número de osteoclastos em modelos semelhantes^{29,30}. Já alguns inibidores da CTSK reduziram a osteoclastogênese *in*

vivo e in vitro, inclusive em modelos estimulados por LPS^{31,32}. Por último, inibidores ectostéricos da Ctsk não influenciaram na osteoclastogênese induzida por RANKL^{16,33,34}. Aqui relatamos que T06 modulou positivamente o número de osteoclastos induzidos por LPS em placas de cultura. O aumento do número de osteoclastos sugere uma limitação para uso clínico da T06. Como T06 inibe a atividade osteoclástica de modo reversível¹⁶, a descontinuação do fármaco in vivo poderia causar um efeito rebote, aumentando a quantidade de osteoclastos ativos e reabsorção óssea, efeito semelhante ao descrito para o Denosumabe³⁵. Obviamente, estudos in vivo utilizando modelos animais de reabsorção óssea inflamatória, como a injeção de LPS em calvária de camundongos ou um modelo de periodontite induzida por ligadura, associados ao tratamento com T06, poderão elucidar essa hipótese.

T06 se difere da Tanshinona IIA pela adição de um grupo sulfato no carbono 16. A modificação na estrutura química para tornar o fármaco solúvel, também alterou parte de sua atividade farmacológica^{36,37}. Foi relatado que Tanshinona IIA inibe a osteoclastogênese induzida por RANKL em células de linhagem RAW 264.7 e suprime a formação de anéis de actina em osteoclastos maduros³⁸. Em um modelo de cocultura de BMMs e osteoblastos de calvária de camundongos, Tanshinona IIA inibiu a osteoclastogênese e a expressão de RANKL e OPG induzida por LPS³⁹. No presente estudo, porém, mostramos que T06 não inibiu a osteoclastogênese induzida por LPS, mantendo intacta a formação de anéis de actina (FIG. 2). Esses resultados sugerem que Tanshinona IIA e T06 atuam por diferentes mecanismos de ação nas células osteoclásticas.

O uso de derivados da *Salvia miltiorrhiza* na medicina chinesa no tratamento das doenças ósseas é justificado, em parte, por suas propriedades anti-inflamatórias⁴⁰. Em contraste, o tratamento com Tanshinona IIA inibiu a osteoclastogênese mas não modulou a expressão de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-15) em macrófagos peritoneais e osteoblastos de camundongos induzidos por LPS³⁹. Aqui relatamos que o tratamento com T06 não alterou os níveis de citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p70, INF- γ , MCP-1 e TNF) em macrófagos de medula óssea induzidos por LPS, corroborando com achados anteriores referentes ao tratamento com Tanshinona IIA.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que T06, um inibidor ectostérico da CTSK, modulou positivamente a osteoclastogênese induzida por LPS em placas de cultura, sendo essa diferença estatisticamente relevante nas concentrações de 2,5 e 0,5 μ M.

A indução da osteoclastogênese por LPS elevou os níveis de citocinas inflamatórias, enquanto o tratamento com T06 não modulou a expressão dessas citocinas.

REFERÊNCIAS

1. Kim J-M, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim J-H. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. 2020 [cited 2021 Sep 18]; Available from: www.mdpi.com/journal/cells
2. Yao D, Huang L, Ke J, Zhang M, Xiao Q, Zhu X. Bone metabolism regulation: Implications for the treatment of bone diseases. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 Sep;129:110494. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220306879>
3. Souza PPC, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest*. 2013;42(7):555–622.
4. Souza PPC, Lerner UH. Finding a toll on the route: The fate of osteoclast progenitors after toll-like receptor activation. *Front Immunol*. 2019;10(JULY):1–12.
5. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual Modulation of Osteoclast Differentiation by Lipopolysaccharide. 2002.
6. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, et al. Gene Expression of Osteoclast Differentiation Factor Is Induced by Lipopolysaccharide in Mouse Osteoblasts Via Toll-Like Receptors. *J Immunol*. 2001;166(5):3574–9.
7. Zhou CC, Xu RS, Wu ZP, Zhang ZW, Yuan Q, Zou SJ, et al. Osteogenesis, Osteoclastogenesis and their Crosstalk in Lipopolysaccharide-induced Periodontitis in Mice. *Chin J Dent Res* [Internet]. 2021 Apr 23;24(1):33–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33890453>
8. AlQranei MS, Chellaiah MA. Osteoclastogenesis in periodontal diseases: Possible mediators and mechanisms. *J Oral Biosci* [Internet]. 2020 Jun;62(2):123–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1349007920300116>

9. 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* [Internet]. 2018 Dec;33(1):890–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29723068>
10. Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem* [Internet]. 2013 Sep 1;394(9):1163–79. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hsz-2013-0134/html>
11. Brömme D, Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2009 May 24;18(5):585–600. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543780902832661>
12. Stoch SA, Zajic S, Stone J, Miller DL, Van Dyck K, Gutierrez MJ, et al. Effect of the Cathepsin K Inhibitor Odanacatib on Bone Resorption Biomarkers in Healthy Postmenopausal Women: Two Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase I Studies. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 Aug 6;86(2):175–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/clpt.2009.60>
13. Engelke K, Fuerst T, Dardzinski B, Kornak J, Ather S, Genant HK, et al. Odanacatib treatment affects trabecular and cortical bone in the femur of postmenopausal women: results of a two-year placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2015;30(1):30–8.
14. Mullard A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(10):669.
15. 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.
16. Panwar P, Xue L, Søe 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.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
18. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
19. AlQranei MS, Senbanjo LT, Aljohani H, Hamza T, Chellaiah MA. Lipopolysaccharide- TLR-4 Axis regulates Osteoclastogenesis independent of RANKL/RANK signaling. *BMC Immunol* [Internet]. 2021 Dec 25;22(1):23. Available from: <https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-021-00409-9>
20. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual Modulation of Osteoclast Differentiation by

- Lipopolysaccharide. Vol. 17, J Bone Miner Res. 2002.
21. Liu J, Wang S, Zhang P, Said-Al-Naief N, Michalek SM, Feng X. Molecular Mechanism of the Bifunctional Role of Lipopolysaccharide in Osteoclastogenesis. J Biol Chem [Internet]. 2009 May;284(18):12512–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820584081>
 22. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction. J Exp Med [Internet]. 2000 Jan 17;191(2):275–86. Available from: [https://rupress.org/jem/article/191/2/275/51000/Tumor-Necrosis-Factor- \$\alpha\$ -Stimulates-Osteoclast](https://rupress.org/jem/article/191/2/275/51000/Tumor-Necrosis-Factor-α-Stimulates-Osteoclast)
 23. Yao Z, Getting SJ, Locke IC. Regulation of TNF-Induced Osteoclast Differentiation. Cells [Internet]. 2021 Dec 31;11(1):132. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/1/132>
 24. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 Directly Inhibits Osteoclast Differentiation by Suppressing Receptor Activator of NF- κ B Signaling Pathways. J Biol Chem [Internet]. 2008 Apr;283(17):11535–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820619482>
 25. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou N. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. Bone [Internet]. 2003 Jan;32(1):1–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328202009158>
 26. McDonald MM, Kim AS, Mulholland BS, Rauner M. New Insights Into Osteoclast Biology. JBMR Plus [Internet]. 2021 Sep 30;5(9). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm4.10539>
 27. Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 Is Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Promotes Human Osteoclast Fusion, and Rescues Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Suppression of Osteoclast Formation. J Biol Chem [Internet]. 2005 Apr;280(16):16163–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820692961>
 28. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarra M, et al. Cathepsin K Knockout Mice Develop Osteopetrosis Due to a Deficit in Matrix Degradation but Not Demineralization. J Bone Miner Res [Internet]. 1999 Oct 1;14(10):1654–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.1999.14.10.1654>
 29. Chen W, Yang S, Abe Y, Li M, Wang Y, Shao J, et al. Novel pycnodysostosis mouse

- model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2007 Feb 15;16(4):410–23. Available from: <http://academic.oup.com/hmg/article/16/4/410/684700/Novel-pycnodysostosis-mouse-model-uncovers>
30. Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhlaoibh R, Risteli J, Laitala-Leinonen T, et al. Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. *Bone* [Internet]. 2005 Jan;36(1):159–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328204003813>
 31. 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* [Internet]. 2015 Aug;86(8):972–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2015.140643>
 32. Strålberg 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* [Internet]. 2017 May;101(5):1233–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3A1016-433R>
 33. 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* [Internet]. 2018;175(6):902–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29278432>
 34. Panwar P, Søe K, Guido RV, Bueno RVC, Delaisse J-M, Brömme D. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Jan;173(2):396–410. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13383>
 35. Elbers LPB, Raterman HG, Lems WF. Bone Mineral Density Loss and Fracture Risk After Discontinuation of Anti-osteoporotic Drug Treatment: A Narrative Review. *Drugs* [Internet]. 2021 Sep 15;81(14):1645–55. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s40265-021-01587-x>
 36. Zhou Z-Y, Zhao W-R, Zhang J, Chen X-L, Tang J-Y. Sodium tanshinone IIA sulfonate: A review of pharmacological activity and pharmacokinetics. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Oct;118:109362. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332219322413>
 37. Kaiser M, Sobottka H, Fischer W, Schaefer M, Nörenberg W. Tanshinone II A

- Sulfonate, but Not Tanshinone II A, Acts as Potent Negative Allosteric Modulator of the Human Purinergic Receptor P2X7. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2014 Sep;350(3):531–42. Available from:
<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.114.214569>
38. Cheng L, Zhou S, Zhao Y, Sun Y, Xu Z, Yuan B, et al. Tanshinone IIA attenuates osteoclastogenesis in ovariectomized mice by inactivating NF- κ B and Akt signaling pathways. *Am J Transl Res* [Internet]. 2018;10(5):1457–68. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29887959>
39. Kwak HB, Sun H-M, Ha H, Kim H-N, Lee J-H, Kim H-H, et al. Tanshinone IIA suppresses inflammatory bone loss by inhibiting the synthesis of prostaglandin E2 in osteoblasts. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2008 Dec;601(1–3):30–7. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299908010674>
40. Ekeuku SO, Pang K-L, Chin K-Y. The Skeletal Effects of Tanshinones: A Review. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 16;26(8):2319. Available from:
<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/8/2319>

* O artigo segue as normas do periódico Revista de Odontologia da UNESP.

ANEXO A – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA



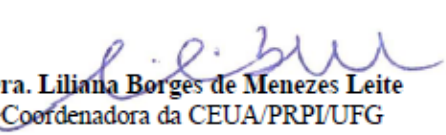
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “Modulação da resposta de células ósseas por citocinas, componentes bacterianos, fármacos e biomateriais”, registrada com o protocolo nº 011/21, sob a responsabilidade de Pedro Paulo Chaves de Souza que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 26/04/2021.

- ☐ Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- ☐ Vigência da autorização (início e fim): 26/04/2021 a 10/05/2026
- ☐ Espécie/linhagem/raça: camundongos *Mus musculus* swiss
- ☐ Nº de animais autorizados: 149 camundongos no período experimental mais 6 para o projeto piloto = total = 155
- ☐ Peso/Idade: 3 dias/ 4 semanas/6 semanas dependendo do protocolo experimental, especificado na ficha de atendimento de pendência.
- ☐ Sexo: machos
- ☐ Origem (fornecedor): Biotério central /UFG


Dra. Lillian Borges de Menezes Leite
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 7 de março de 2022

Victor Hugo Fernandes Vasconcelos