UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba - Faculdade de Odontologia

MARCOS VINÍCIUS ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREVENTIVO DA TANSHINONA SULFONATO NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL. ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E INFLAMATÓRIOS

Araçatuba - SP
2026

MARCOS VINÍCIUS ALVES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREVENTIVO DA TANSHINONA SULFONATO NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL. ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E INFLAMATÓRIOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

Araçatuba - SP
2026

Dedico este trabalho à minha família, meus professores, e à todos que me auxiliaram no período da graduação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer minha família: meu pai, Marcos; minha mãe Luciete; meus irmãos, João e Luís; meus avós, Solange, Maria Helena e José Carlos; minha tia, Eva. Por todo apoio oferecido durante a minha graduação, fazendo com que o meu sonho se tornasse possível.

Agradeço também o Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon, que me auxiliou durante toda a realização do trabalho, sendo muito importante para a conclusão do mesmo. Como também foi muito importante sendo meu orientador durante o período da minha iniciação científica.

A todos os professores da graduação, que me capacitaram durantes esses anos para eu me tornar um bom Cirurgião-Dentista.

A todos amigos que fiz nesse período, os quais foram muito importantes para mim, fornecendo companhia, momentos divertidos e excelentes lembranças que ficarão para sempre na minha memória.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA – UNESP), sob direção do Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, em conjunto com o vice-diretor Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra, por todas as experiências proporcionadas pela instituição durante todos estes anos de graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2024/ 21561-5.

“As universidades serão o que são suas bibliotecas”

Gelfand, 1968

RESUMO

ALVES. M, V. **Avaliação do potencial preventivo da Tanshinona sulfonato na periodontite experimental. Aspectos radiográficos e inflamatórios.** 2026. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dentário, resultante da interação entre biofilme disbiótico e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, com participação central da atividade osteoclástica. As tanshinonas, compostos naturais derivados da Salvia miltiorrhiza, apresentam propriedades anti-inflamatórias e antirreabsortivas, destacando-se a tanshinona IIA sulfonato (STS). Este estudo avaliou os efeitos da aplicação local de STS sobre a inflamação periodontal e a perda óssea alveolar em um modelo murino de periodontite induzida por ligadura. Camundongos C57BL/6 foram distribuídos em quatro grupos: Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Controle (sem intervenção), Periodontite (ligadura bilateral com tratamento veículo – agua destilada), STS1 e STS5 (ligadura bilateral associada ao tratamento local com STS nas doses de 1 ou 5 mg/kg, iniciado dois dias antes da indução da periodontite e mantido por 12 dias). As análises microtomográficas demonstraram que a periodontite induziu aumento da distância JCE–COA, redução do BV/TV, da densidade mineral óssea e deterioração da microarquitetura trabecular. O tratamento com STS, em ambas as dosagens, atenuou significativamente esses efeitos, preservando a altura óssea alveolar, o volume ósseo e a qualidade trabecular. As análises histológicas e estereométricas confirmaram redução do infiltrado inflamatório, aumento do número de fibroblastos e diminuição da densidade vascular nos grupos tratados. Além disso, a coloração por Picrosirius Red evidenciou preservação parcial da organização das fibras colágenas no tecido periodontal. Em conjunto, os resultados demonstram que a aplicação local de STS exerce efeitos anti-inflamatórios, antirreabsortivos e teciduais protetores, contribuindo para a preservação da integridade óssea alveolar e do tecido conjuntivo periodontal. Esses achados reforçam o potencial terapêutico da tanshinona IIA sulfonato como uma estratégia adjuvante para o controle da inflamação e da reabsorção óssea associadas à periodontite, nas condições estudadas.

Palavras-chave: Doença periodontal; osso alveolar; tanshinona IIa.

ABSTRACT

ALVES, M. V. **Evaluation of the Preventive Potential of Tanshinone sulfonate in Experimental Periodontitis: Radiographic and Inflammatory Aspects.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Periodontitis is a chronic inflammatory disease characterized by the destruction of the tooth-supporting tissues, resulting from the interaction between dysbiotic biofilm and the host immune-inflammatory response, with a central role of osteoclastic activity. Tanshinones, natural compounds derived from *Salvia miltiorrhiza*, exhibit anti-inflammatory and anti-resorptive properties, with sodium tanshinone IIA sulfonate (STS) being one of the most promising derivatives. This study evaluated the effects of local STS administration on periodontal inflammation and alveolar bone loss in a murine model of ligature-induced periodontitis. C57BL/6 mice were allocated into four groups: Control (no intervention), Periodontitis (bilateral ligature with vehicle treatment – distilled water), STS1, and STS5 (bilateral ligature associated with local treatment with STS at doses of 1 or 5 mg/kg, initiated two days before periodontitis induction and maintained for 12 days). Micro-computed tomography analyses demonstrated that periodontitis increased the CEJ–ABC distance, reduced bone volume fraction (BV/TV) and bone mineral density, and impaired trabecular microarchitecture. Treatment with STS at both doses significantly attenuated these effects, preserving alveolar bone height, bone volume, and trabecular quality. Histological and stereometric analyses confirmed a reduction in inflammatory infiltrate, an increase in the number of fibroblasts, and a decrease in vascular density in the treated groups. Furthermore, Picrosirius Red staining demonstrated partial preservation of collagen fiber organization within the periodontal tissues. Collectively, these findings demonstrate that local STS administration exerts anti-inflammatory, anti-resorptive, and tissue-protective effects, contributing to the preservation of alveolar bone integrity and periodontal connective tissue. These results support the therapeutic potential of sodium tanshinone IIA sulfonate as an adjunctive strategy for controlling inflammation and bone resorption associated with periodontitis under the conditions investigated.

Keywords: Periodontal disease; alveolar bone; tanshinone IIA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da tanshinona IIA sódio sulfonato. 15
Figura 2 – Desenho experimental do estudo. 17
Figura 3 – Colocação das ligaduras bilaterais no primeiro molar maxilar. 18
Figura 4 – Ilustração representativa da indução da perda óssea alveolar induzida e análise microtomográfica. 25
Figura 5 – Analise histológica realizada com a coloração de hematoxilina e eosina. 28
Figura 6 – Quantificação dos achados histológicos realizados por meio de análise estereométrica semiquantitativa. 29
Figura 7 – Análise do conteúdo colágeno em tecidos periodontais por coloração de Picrosirius red. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

STS	Tanshinona sódio sulfonato
STS1	Tanshinona sódio sulfonato na dosagem 1mg/kg
STS5	Tanshinona sódio sulfonato na dosagem 5mg/kg
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
JCE	Junção cemento-esmalte
ABC	Crista óssea alveolar
BV	Volume ósseo
TV	Tecido ósseo
ROI	Região de interesse
EJ	Epitélio juncional
CO	Crista óssea
COA	Crista óssea alveolar
BMD	Densidade mineral óssea
HE	Hematoxilina e eosina
RAR	Raspagem e alisamento radicular
Tb.N	Número de trábeculas
Tb.Sp	Separação de trábeculas
Tb.Th	Espessura de trábeculas
CaOH	Hidróxido de cálcio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 OBJETIVO 15
3 MATERIAIS E MÉTODOS 15
3.1 Tanshinonas 15
3.2 Desenho experimental 16
3.3 Indução da doença periodontal 17
3.4 Administração da STS 18
3.5 Eutanásia e coleta de amostras 19
3.6 Análise microtomográfica 19
3.7 Análise histológica estereométrica 20
3.8 Coloração Pricosirius red 22
3.9 Análise estatística 22
4 RESULTADOS 23
4.1 Análise microtomográfica 23
4.2 Análise estereométrica em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) 26
4.3 Análise de PicroSirius Red 30

5 DISCUSSÃO 32
6 CONCLUSÃO 35
REFERÊNCIAS 36
ANEXOS 42

1 INTRODUÇÃO

A periodontite, uma condição inflamatória crônica dos tecidos periodontais ao redor dos dentes, é caracterizada pela perda de estruturas de suporte do dente, como gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cemento,[1-3] podendo resultar na perda dos dentes se não for tratada.[1, 4] A etiologia da periodontite é multifatorial, na qual a presença de um biofilme disbiótico, em contato íntimo com a margem gengival, inicia a resposta imunoinflamatória.[3, 5] A periodontite é a sexta doença inflamatória crônica mais prevalente no mundo[3, 5] e é considerada a causa mais importante de perda de dentes na população adulta,[3, 5] apresentando uma prevalência ao redor de 11% na população mundial afetando aproximadamente 734 milhões de adultos.[6]

Diferentes tipos de células agem juntos para ditar a homeostase dos tecidos periodontais. Múltiplos tipos celulares envolvidos no microambiente periodontal, incluindo células estromais (osteoblasto, fibroblasto, células epiteliais) e células imunes inatas e adaptativas (neutrófilos, macrófagos, células dendriticas, linfócitos T e B) contribuem através da liberação de suas moléculas na tentativa de manter a homeostase nos tecidos periodontais. Assim, a resposta imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental na proteção contra os micro-organismos patogênicos.[7] Após o acúmulo do biofilme bacteriano, as bactérias patogênicas são capazes de atravessar a junção epitelial e passam para o tecido conjuntivo gengival, onde estimulam as células epiteliais gengivais e fibroblastos para desencadear as respostas inflamatórias iniciais.[8] Essas células periodontais residentes detectam PAMP bacteriano, como o LPS, que se liga aos receptores Toll-like (TLR4/2), desencadeando o recrutamento de várias proteínas cinases na extremidade citoplasmática dos receptores, causando, por fim, a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como fator nuclear kappa B (NFκB), proteína ativadora 1 (AP-1) e fator nuclear de células T ativadas (NFATc1), que induz a síntese e liberação de mediadores para desencadear a resposta inflamatória.

A microbiota periodontal patogênica inicia os processos inflamatórios, mas é a ativação de leucócitos e células T e B no tecido conjuntivo, em resposta a agressão bacteriana, que leva à produção de múltiplos mediadores inflamatórios, enzimas degradadoras de tecido (MMP), e ao aumento da expressão do RANKL, que é o principal fator de ativação para osteoclastos.[9] Esses eventos celulares são

responsáveis, em sua grande maioria, pela inflamação dos tecidos periodontais, finalmente causando a perda de tecido ósseo de suporte.[10-12] A remodelação óssea homeostática consiste na atividade catabólica óssea (reabsorção óssea) mediada pelos osteoclastos, seguida pela atividade anabólica óssea pelos osteoblastos. Fatores regenerativos ósseos que estimulam a atividade anabólica dos osteoblastos são liberados durante a reabsorção óssea.[13, 14] Esta estimulação da atividade osteoblástica em resposta à reabsorção mediada por osteoclasto é denominada "acoplamento"[15] que se acredita mediar a remodelação homeostática do osso saudável. No entanto, o consenso atual sustenta que o mecanismo de acoplamento é desregulado no contexto da periodontite.[16] Isso explica, em parte, por que a regeneração óssea raramente ocorre no tecido periodontal afetado pela periodontite.

De acordo com a diretriz de prática clínica da Federação Europeia de Periodontologia, as recomendações para o tratamento da periodontite estágio I-III são baseadas em quatro intervenções diferentes [17]. O primeiro passo da terapia são as mudanças comportamentais e o controle do biofilme supragengival, inflamação gengival e fatores de risco associados. A segunda etapa da terapia visa o controle do biofilme e cálculo supra e subgengival por meio de instrumentação subgengival, podendo incluir medicamentos adjuvantes locais ou sistêmicos. A terceira etapa consiste em tratar áreas não responsivas à segunda etapa e incluir diferentes tipos de intervenções cirúrgicas periodontais. Finalmente, os cuidados periodontais de suporte devem ser implementados para estender os benefícios e manter a estabilidade periodontal ao longo do tempo [18]. O tratamento periodontal básico, que consiste na eliminação do biofilme bacteriano por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR), associado ou não à antimicrobianos locais e sistêmicos, remove mecanicamente o biofilme (fator etiológico primário) a fim de controlar a inflamação e interromper a progressão da doença. Entretanto, o tratamento periodontal básico, não alcança resultados favoráveis em todos os pacientes acometidos pelas diversas formas da doença.[19] Desta forma, o uso de terapias complementares que visam modular os aspectos destrutivos da resposta imune, tem sido investigado como uma alternativa para alcançar melhores resultados clínicos à longo prazo.[20]

Recentemente, crescente interesse científico tem emergido em relação a uma classe de compostos naturais, com inúmeras propriedades biológicas e alto potencial modulatório, denominadas Tanshinonas. As tanshinonas são quinonas diterpenóides

lipossolúveis isoladas de Danshen, raízes secas de um tradicional medicamento chinês, a Salva miltiorrhiza. Eles são os principais constituintes farmacológicos lipossolúveis de Danshen e dão à raiz sua coloração marrom-avermelhado.[34] As principais tanshinonas isoladas de Danshen incluem: 15,16-dihidrotanshinona (D-T), tanshinona I (T-I), criptotanshinona (C-T) e tanshinona IIA sulfonato (T06).[35] Estudo prévio demonstrou que a tanshinona IIa sulfonato (T06) poderia bloquear seletivamente a atividade de colagenase da Catepsina K sem afetar a atividade da protease e a osteoclastogênese.[36] Estudos in vitro também relataram que T-IIA possui efeito antiinflamatório ao inibir a ativação da via do fator nuclear kappa B (NF-kB).[37-40] Esses estudos sugerem o potencial das tanshinonas como um agente modulador antirreabsortivo. A capacidade de prevenir a reabsorção óssea sem interferir na atividade dos osteoblastos, um diferencial dos inibidores de catepsina K, associada ao efeito seletivo observado no tratamento com a tanshinona-IIa sulfonato fornece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de medicamentos antirreabsortivos específicos, com baixa associação à efeitos colaterais.

A literatura atual demonstra que as tanshinonas exercem atividade anti-osteoporótica suprimindo a osteoclastogênese e melhorando a osteoblastogênese em camundongos.[36] Tanshinonas exercem atividade anti-osteoclastogênica por meio do bloqueio da ativação induzida por RANKL das vias de sinalização de NF-kB, MAPK, Akt e M-CSF / c-Src. As tanshinonas previnem a apoptose de osteoblastos e favorecem a osteoblastogênese ao melhorar o estresse oxidativo e a inflamação.[38, 39] Estudos em animais revelaram que as tanshinonas previnem a deterioração esquelética em modelos de osteoporose induzida por deficiência de estrogênio, diabetes e inflamação. Também foi demonstrado que as tanshinonas previnem osteólise e melhoram a cicatrização de fraturas em modelos animais.[41] Estudos prévios demonstram que as tanshinonas aumentam a atividade dos genes osteogênicos, favorecendo seu efeito estimulatório na diferenciação de osteoblastos.[42, 43]

O tratamento com tanshinona-IIA sulfonato tem sido relatado como tendo a capacidade de suprimir a osteoclastogênese induzida por RANKL e M-CSF em células precursoras e na função dos osteoclastos.[44, 45] Tanshinona-IIA impede a ativação induzida por RANKL de TRAF6, que por sua vez reduz a ativação das vias NF-kB, MAPK, Akt e c-Src e inibe a formação de osteoclastos e sua atividade, marcada por expressão reduzida de TRAP e MMP9.[44, 45]

A sinalização RANK-RANKL também regula a expressão Catepsina K[46] que é uma protease semelhante a papaína, e membro da família da catepsina de proteases lisossomais, tendo como alvo catalítico o aminoácido cisteína.[47] No osso, catepsina K 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 óssea[48] Além disso, essa protease também pode ativar MMP-9[49] e degradar colágeno tipo II[50] e osteonectina.[51] Assim, a catepsina K representa um potencial alvo da terapia anti-osteoporose.

A inibição de catepsina K não afeta a formação óssea [52], sugerindo que a formação e reabsorção óssea são desacopladas.[53] Além disso, a formação e sobrevivência de osteoclastos necessárias para a resposta de formação óssea osteoblástica durante a remodelação não são afetados pela inibição de catepsina K.[54] A tanshinona-IIa sulfonato inibe a atividade de Catepsina K, mas não altera o número de osteoclastos em camundongos com osteoporose induzida por OVX,[36] o que sugere que este composto pode ser um inibidor seletivo de Catepsina K. A seletividade garante a comunicação entre os osteoblastos e os osteoclastos normais e assim, a remodelação óssea não é interrompida.

Embora alguns estudos in vitro e in vivo tenham indicado as propriedades anti-inflamatórias e anti-osteolíticas da administração sistêmica das tanshinonas, especialmente para o tratamento de doenças ósseas metabólicas como a osteoporose[36], ainda são limitadas as evidências sobre seus efeitos na prevenção da destruição periodontal e da perda óssea alveolar. A aplicação local pode aumentar a biodisponibilidade de compostos no sítio alvo, potencializando seus efeitos e reduzindo a quantidade administrada, o que pode minimizar a ocorrência de efeitos secundários e facilitar adesão do paciente ao tratamento, além de permitir sua aplicação somente nos sítios afetados. Todos estes fatores podem ser particularmente interessantes no tratamento da periodontite.

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial preventivo da aplicação local de tanshinona IIA sulfonato sobre a inflamação periodontal e a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite induzida por ligadura, por meio de análises radiográficas, histológicas e inflamatórias.

2 OBJETIVO

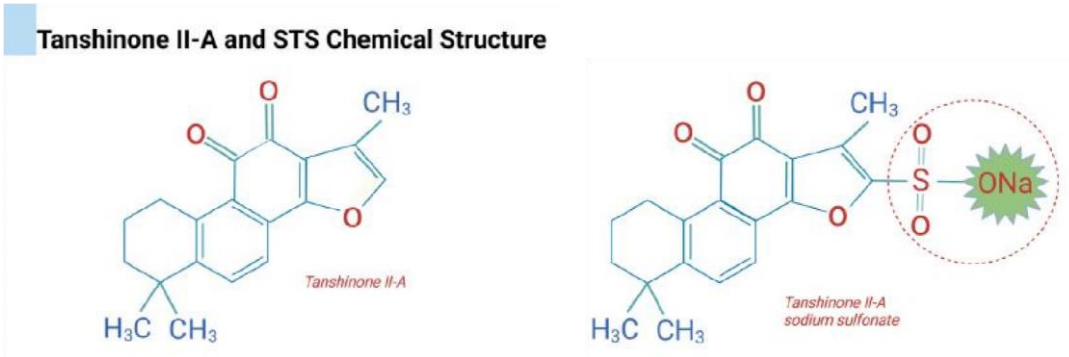
O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial preventivo da aplicação local de tanshinona IIA sulfonato (STS) sobre a inflamação periodontal e a perda óssea alveolar em um modelo murino de periodontite induzida por ligadura. Para isso, foram analisados os efeitos do tratamento sobre a perda óssea alveolar, a microarquitetura óssea, a resposta inflamatória e a organização do tecido conjuntivo periodontal, por meio de análises microtomográficas, histológicas, estereométricas e histoquímicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tanshinonas

A tanshinona sódio sulfonato (SML2517) foi obtida diretamente da empresa Sigma-Aldrich. A tanshinona sódio sulfonato (STS) é um derivado solúvel da tanshinona IIa diferindo-se apenas pela adição de dos canais de potássio na molécula, conforme demonstrado nas imagens abaixo.

Figura 1- Estrutura química da tanshinona IIA sódio sulfonato.



Fonte: Adaptado de "*de Molon, RS* [1]*.* Dent J (Basel). 2025 Jul 9;13(7):309. doi: 10.3390/dj13070309.

Legenda: Estrutura química da tanshinona IIA sódio sulfonato.

3.2 Desenho experimental

Para este estudo foram utilizados 40 camundongos C57BL6/J obtidos do biotério da Faculdade de medicina da UNESP Botucatu com 8 semanas de idade e com peso médio de 18-20g. Ao longo do período experimental, os camundongos foram mantidos nas instalações para animais do biotério da faculdade de Odontologia da FOA-UNESP com temperatura (23° C ± 2° C), e umidade (65-70%) controladas, e com um com ciclo de claro/escuro de 12-horas. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, individualizados em 5 animais por gaiola, alimentados com uma dieta de laboratório (Labina / Purina) e com água *ad libitum.* O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, e foi aprovado com o protocolo #0549/2022. O projeto foi realizado seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e de acordo com as diretrizes do ARRIVE guidelines.

Para avaliar os efeitos preventivos da STS em camundongos, duas dosagens do composto (1mg/kg e 5mg/kg - 5ul) ou do veículo (agua destilada - 5ul) foram administrados via injeção local no tecido gengival na superfície palatina da maxila diariamente, iniciando-se dois dias antes da colocação das ligaduras bilateralmente até o final do período experimental (dias -2 até 12). Assim, os grupos foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a modalidade de tratamento e foram divididos randomicamente em 4 grupos experimentais:

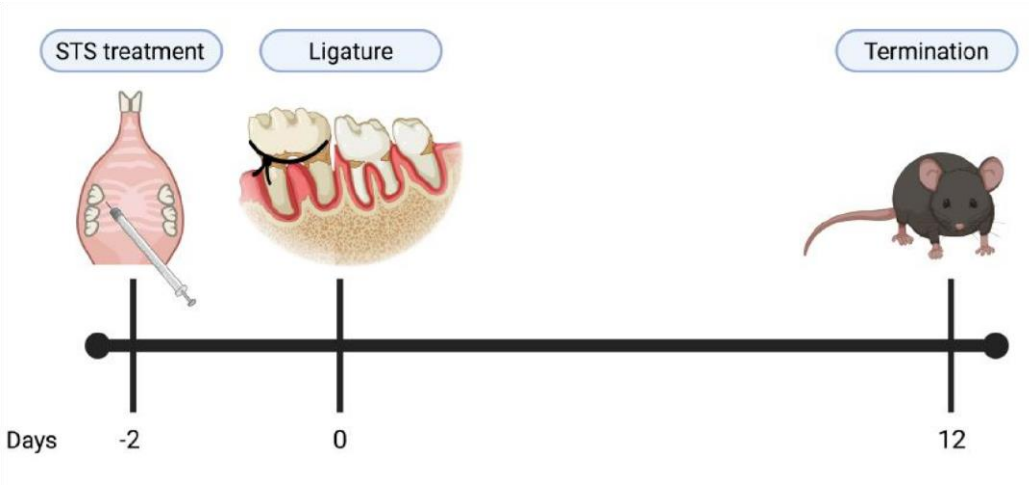
1. Grupo C (controle) – Os animais não receberam nenhuma intervenção cirúrgica e nenhuma intervenção terapêutica;

2. Grupo P – Os animais receberam tratamento com água destilada dois dias antes da colocação da ligadura (-2). No dia 0, ligaduras foram instaladas bilateralmente ao redor dos primeiros molares maxilares e continuaram o tratamento por 12 dias.

3. Grupo STS1 – Os animais receberam tratamento com STS 1mg/kg dois dias antes da colocação da ligadura (-2). No dia 0, ligaduras foram instaladas bilateralmente ao redor dos primeiros molares maxilares e continuaram o tratamento com STS1 por 12 dias.

4. Grupo STS 5 – Os animais receberam tratamento com STS 5mg/kg dois dias antes da colocação da ligadura (-2). No dia 0, ligaduras foram instaladas bilateralmente ao redor dos primeiros molares maxilares e continuaram o tratamento com STS1 por 12 dias.

Figura 2- Desenho experimental do estudo.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Legenda: Desenho experimental do estudo.

3.3 Indução da doença periodontal

A indução da periodontite pela colocação de ligaduras foi realizada como descrito previamente.[32, 56,58-59] Após a anestesia geral com quetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) administrada por injeção intraperitoneal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica e, com auxílio de um suporte, a boca permaneceu aberta ao longo da manipulação. Com a boca aberta e língua imobilizada, uma sonda periodontal foi inserida entre o primeiro e segundo molar superior a fim de proporcionar espaço para a colocação do fio. Assim, com o uso de uma pinça adaptada, o fio de nylon (Ethicon 5.0) foi inserido entre os molares e, após seu posicionamento correto, foi amarrado ao redor da cervical do dente. O ressecamento da língua e dos olhos do animal, devido ao tempo que permaneceram parados com os olhos e boca abertos, foi controlado com irrigação com solução salina.

Figura 3- Colocação das ligaduras bilaterais no primeiro molar maxilar.



Fonte: de “de Molon RS et al.”[6] *Bone Research* 2026 Jan 3;14(1):1. doi: 10.1038/s41413-025-00478-1.

Legenda: Colocação das ligaduras bilaterais no primeiro molar maxilar.

3.4 Administração da STS

Para a diluição da STS foi utilizada água destilada, aquecida a 45°C e posteriormente agitada com auxílio do vórtex por 2 minutos até o momento do seu uso. O composto foi diluído diariamente e armazenado a 4^0C ao abrigo da luz previamente a sua utilização.

Para o procedimento de administração local, 5µL da STS, ou da solução veículo, foram aplicadas por meio de injeção no tecido gengival ao redor dos primeiros molares superiores, diariamente, 1 vez ao dia, durante 14 dias. Para as aplicações, os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória utilizando isofluorano em vaporizador adaptado (Sistema VetFlo de anestesia para ratos com caixa de indução (Harvard Apparatus Holliston, Massachusetts EUA). Após a anestesia, as soluções foram injetadas no tecido gengival nas superfícies vestibular e palatina ao redor do primeiro molar com o auxílio de uma seringa apropriada (Hamilton^R). A dosagem do medicamente foi baseado em estudo previamente publicado e em nossos estudos prévios e estudos pilotos.[36,61-63]

3.5 Eutanásia e coleta das amostras

Após o período experimental, os animais de cada um dos grupos experimentais foram anestesiados e em seguida foram eutanaziados por deslocamento cervical. As maxilas foram cuidadosamente removidas, e subdivididas em duas hemimaxilas, no qual a hemi-maxila do lado direito teve o tecido gengival ao redor dos primeiros e segundos molares removidos para extração de mRNA (qPCR em tempo real) e proteína por western-blotting (para esta análise, foram utilizados mais 20 animais, para possibilitar um n=10 por grupo). Para esta finalidade, os tecidos coletados foram armazenados em nitrogênio líquido logo após sua remoção e em seguida transferidos para o freezer -80°C até o momento do processamento para as análises. Após remoção do tecido gengival, as mesmas hemimaxilas foram fixadas em parafolmaldeído 4% por 48h, e transferidas para etanol 70% para avaliação da perda óssea por microtomografia computadorizada. Já as hemimaxilas do lado esquerdo, ainda contendo o tecido mole ao redor dos molares, foram armazenadas em paraformaldeído 4% por 48h e então foram descalcificadas em solução de EDTA 10%, pH 8 por 45 dias para o preparo e inclusão em parafina, e posteriormente utilizadas para as análises histológica (imuno-histoquímica, análise estereométrica em lâminas corada em H/E e picro-sirius red).

3.6 Análise microtomográfica

Antes do escaneamento, as amostras da maxila foram lavadas em água destilada e armazenadas em solução salina a 0,9% durante a noite para reidratação das peças. Amostras ósseas da maxila foram escaneadas utilizando-se um sistema de microtomografia computadorizada (μCT Skyscan 1272; Skyscan, Kontich, Belgium). Os parâmetros de escaneamento foram escolhidos com base em trabalhos publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Brevemente, os parâmetros utilizados foram: gerador de raios-X operado a 70 kVp, feixe de corrente em 142 μA, filtração de alumínio de 0.5 mm de espessura em uma resolução de imagem de 8.74 μm; passo de rotação de 0.05°. Para reconstrução das amostras (NRecon 1.6.1.5; Bruker), os seguintes parâmetros foram utilizados: redução de artefatos em anel: 3, defect-pixel masking: 0%; beam-hardening: 20%, smoothing: 1, e calculado individualmente os valores de compensação de desalinhamento.

Após as reconstruções, para a realização das análises lineares, dados volumétricos foram importados no software Data Viewer (Skyscan, Kontich, Belgium) para geração de imagens reconstruídas multiplanares. Na maxila, a distância da junção cemento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA) foi mensurada na superfície mesial e distal do primeiro e segundo molar utilizando-se cortes sagitais na área vestibular. Nessas medidas foram feitas media e descritas com um único resultado. Ademais, perda óssea linear também foi quantificada na região palatina (locais onde foi feito o tratamento) na raiz palatina do primeiro molar superior, utilizando-se corte coronal. Analises volumétricas foram realizadas após a aquisição das mensurações lineares. Para isso, volume ósseo (BV), tecido ósseo (TV) e fração de volume ósseo (BV/TV) foram analisados utilizando-se o software CTAn (CT Analyzer 1.12.0.0 - Skyscan, Kontich, Belgium) em cortes axiais (1024 x 1024). Para isso, uma região de interesse (ROI) foi delineada a partir dos ápices das raízes dos molares até a crista alveolar, e a partir da raiz mesial do primeiro molar até a raiz distal do segundo molar. Em detalhe, o ROI consistiu de 60 cortes na maxila da porção apical do dente até a JCE. O limite inferior foi definido quando aparecerão os ápices das raízes mesial do primeiro molar e distal do terceiro molar. O tecido ósseo foi manualmente desenhado em intervalos regulares a cada 10 planos utilizando-se uma ferramenta interpolada. Subsequentemente, as raízes foram desenhadas manualmente nos 60 cortes selecionados e foram excluídas do osso. Assim, a área óssea sem as raízes e ligamento periodontal foi incluída no ROI. Mensurações da arquitetura óssea na maxila também foi realizada utilizando o software CTAn para avaliação do número de trabéculas (Tb.N), separação de trabéculas (Tb.Sp) e espessura de trabéculas (Tb.Th). A densidade mineral óssea (BMD) também foi avaliada. Para isso, a calibração do software CTAnalyzer foi realizada pela determinação dos valores de hidroxiapatita de cálcio (CaOH) dos dois phantoms contendo 0,25 e 0,75 g de CaOH/cm^3. Os phantoms foram escaneados de acordo com os parâmetros utilizados para o escaneamento e reconstrução das maxilas, conforme previamente descrito.[23,64-65]

3.7 Análise histológica estereométrica

As peças foram descalcificadas em EDTA (10%, pH 8.0) durante 45 dias e posteriormente foram incluídas em parafina. Cortes seriados de 5µm de espessura foram

obtidos no plano vestíbulo-palatino, montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H/E).

Os cortes histológicos foram submetidos à análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório. A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (na magnificação de 200X). Um total de 3 cortes foram avaliados por dente. Um intervalo 100µm foi dado entre esses cortes com o objetivo de se obter em 300µm de extensão, áreas representativas das porções mesial, média e distal do dente. As áreas de interesse dos cortes pré- selecionados foram escaneadas com um scanner digital próprio para lâminas Aperio ScanScope CS (Aperio, EUA) e as lâminas capturadas foram salvas no HD externo para posterior análise utilizando o software especifico Aperio ImageScope V11.1.2.

A técnica estereométrica de contagem de pontos foi empregada nos cortes corados com H/E para avaliação da proporção de componentes teciduais coincidentes com os pontos de intersecção, em um plano bidimensional, de acordo com trabalho previamente publicado.[23,64-66] Este procedimento permitiu a avaliação quantitativa do quadro inflamatório nas proximidades dos tecidos periodontais. Com esta finalidade, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos, matriz extracelular e outras estruturas. Nos cortes vestíbulo-palatino das maxilas, a região palatina foi quantificada, como descrito: A- Submarginal - o tecido conjuntivo subjacente ao sulco gengival, junto à base do epitélio juncional (EJ) – O limite coronal será representado pela borda apical do epitélio juncional e a estrutura dental correspondente ao limite medial. B- Supracrestal - o tecido conjuntivo próximo ao topo da crista óssea (CO) – O limite apical foi delimitado adjacente a porção mais coronal da crista óssea e a estrutura dental correspondente ao limite medial.

Após a captura das imagens, a quantificação foi feita com o auxílio de uma grade confeccionada com 17.765 μm^2 de área, e com 32 (9x4) quadrados de 30µm. Esta grade foi posicionada (sobreposta) preenchendo as regiões de interesse da imagem utilizando o software Adobe Photoshop CC. Para cada grade, foi contado 50 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas. Em seguida, foi feita uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados baseado em trabalhos prévios para a representação gráfica da estereometria.

3.8 Coloração PicroSirius Red

A avaliação das fibras de colágeno no ligamento periodontal do primeiro molar maxilar foi realizada por meio da técnica de coloração Picro-sirius red e da quantificação de fibras birrefringentes.[59] Essa avaliação foi baseada na birrefringência dos feixes de fibras de colágeno, conforme descrito anteriormente.[60] Para garantir consistência e eliminar possíveis discrepâncias decorrentes do procedimento de coloração, todas as seções (compreendendo 10 seções semi-sequenciais de cada maxila) foram simultaneamente coradas com corante Picrosirius Red a 0,1% por uma hora, lavadas em duas mudanças de água acidificada, desidratadas em três mudanças de etanol a 100%, diafanizados em xilol e montadas em meio resinoso (Permount, Fisher Scientific, New Jersey, USA). Essas seções, com uma espessura de 5 µm, foram subsequentemente submetidas à análise usando uma lente polarizadora acoplada a um microscópio invertido binocular (Leica). As imagens obtidas foram capturadas sob os mesmos parâmetros, ou seja, intensidade de luz idêntica e um ângulo da lente polarizadora ajustado a 90° em relação à fonte de luz, como descrito previamente.[67,68] A região de interesse, englobando as fibras de colágeno no ligamento periodontal do primeiro molar maxilar, foi definida usando o software Adobe Photoshop CS6. Analisaremos a estrutura e organização das fibras de colágeno no ligamento periodontal sob microscopia de campo claro e polarizada nos quatro grupos experimentais.

3.9 Análise estatística

Para o estudo in vivo, o cálculo do tamanho da amostra foi calculado utilizando-se o software G*Power 3.1 e foi baseado em estudo previamente publicado.[32,66] Reabsorção inflamatória do osso alveolar foi estabelecido como sendo o desfecho primário do estudo. O tamanho do efeito foi calculado considerando um erro alpha de 0.05 (α=0,05 – erro do tipo II) e poder de teste de 80% (1β=0,80 – erro tipo I) para detectar uma diferença de aproximadamente 20% de perda óssea alveolar entre o grupo teste e controle. Assim, o tamanho do efeito foi determinado como sendo de 2.91. Por conseguinte, o número mínimo de 8 animais por grupo foi considerado necessário. Considerando que poderá haver alguma morte inesperada, 10 animais por grupo serão incluídos.

Os dados obtidos nas diferentes analises foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Ind., San Diego, CA, EUA). O objetivo da análise foi comparar os resultados de cada desfecho de acordo com os tratamentos. A normalidade dos dados foi verificada utilizando-se o teste de D'Agostino and Pearson. Uma vez que todas as análises investigadas obtiveram distribuição normal dos dados, foi utilizando ANOVA com teste post-hoc de Tukey para comparações pareadas. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) em todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 Análise microtomográfica

Para avaliar os efeitos protetores ósseos do tratamento com tanshinona (STS) na prevenção da perda óssea periodontal induzida por ligadura em camundongos (Fig. 4A e B), foi realizada a análise por microtomografia computadorizada (micro-CT). Os principais parâmetros avaliados incluíram medidas lineares da perda óssea periodontal, definidas como a distância entre a junção cemento-esmalte e a crista óssea alveolar (CEJ-ABC), tanto na região bucal (média entre as raízes mesial e distal do primeiro molar e a face mesial do segundo molar) quanto na região palatina (Fig. 4C e D). Outros desfechos incluíram a densidade mineral óssea (BMD) (Fig. 4E), a fração de volume ósseo (volume ósseo/volume tecidual, BV/TV) (Fig. 4F) e os índices da microarquitetura trabecular: espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação trabecular (Tb.Sp) (Fig. 4G–I).

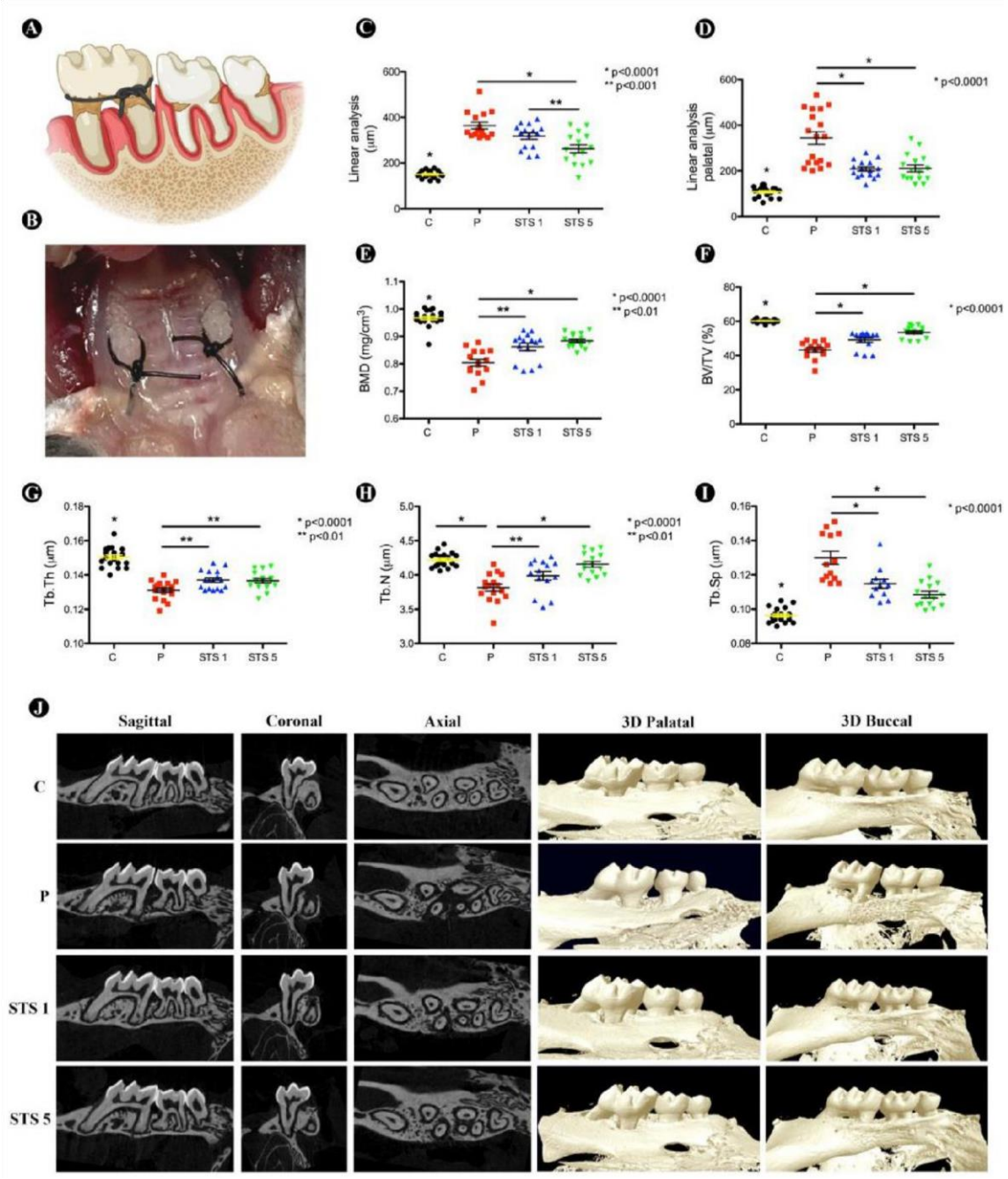
A distância CEJ-ABC, um indicador primário de perda óssea periodontal, foi significativamente maior no grupo P em comparação ao grupo C, confirmando a indução bem-sucedida da perda óssea alveolar. Ambos os grupos tratados com tanshinona (STS1 e STS5) apresentaram distâncias CEJ-ABC marcadamente reduzidas em relação ao grupo P, sendo o efeito mais pronunciado com a dose mais alta (STS5), especialmente na região bucal. Na região palatina, onde as injeções de STS foram administradas, o tratamento com tanshinona preservou significativamente a altura óssea, restaurando as distâncias CEJ-ABC (Fig. 4C e D) em ambas as dosagens. Essas reduções foram estatisticamente significativas ($p < 0.0001$), especialmente na região palatina.

BMD, uma medida crítica da qualidade e integridade estrutural do osso, foi significativamente reduzida no grupo P, refletindo a desmineralização óssea associada à doença. O tratamento com ambas as doses de STS restaurou a BMD em direção aos valores do grupo controle, com melhorias estatisticamente significativas. Embora a BMD tenha permanecido mais alta no grupo C, o tratamento com tanshinona aumentou substancialmente a densidade mineral óssea nos camundongos doentes, ressaltando seu papel na reversão da desmineralização óssea. A análise volumétrica óssea revelou uma redução significativa no volume ósseo no grupo P em comparação ao controle, validando ainda mais a eficácia do modelo de doença. O tratamento com STS1 e STS5 inibiu significativamente a reabsorção óssea, aumentando o volume ósseo em relação ao grupo P.

A avaliação adicional da microarquitetura do osso trabecular revelou deterioração estrutural relacionada à doença. Tb.Th foi significativamente reduzida no grupo P, consistente com a degradação óssea. Ambos os tratamentos com STS (STS1 e STS5) melhoraram significativamente a espessura trabecular, indicando melhora na qualidade óssea. Tb.N, que também foi reduzido no grupo P, aumentou significativamente nos camundongos tratados com tanshinona, demonstrando maior densidade da rede trabecular. Por outro lado, Tb.Sp, significativamente elevada no grupo P devido à rarefação trabecular, foi reduzida após o tratamento com STS, indicando reversão da deterioração estrutural óssea.

Além disso, imagens bidimensionais de micro-CT (visões sagital, coronal e axial), juntamente com reconstruções tridimensionais das perspectivas palatina e bucal, confirmaram visualmente esses achados. Os camundongos tratados com tanshinona apresentaram melhor preservação da morfologia óssea alveolar e da arquitetura trabecular em comparação ao grupo P não tratado (Fig. 4J). Em conjunto, o tratamento com tanshinona em ambas as doses testadas (STS1 e STS5) atenuou de forma eficaz a perda óssea alveolar induzida por periodontite, preservou a altura do osso alveolar, melhorou a densidade mineral óssea e manteve a estrutura do osso trabecular. Esses efeitos protetores sobre o metabolismo ósseo destacam o potencial da tanshinona como agente terapêutico promissor para o tratamento da doença periodontal, especialmente devido à sua ação dupla em inibir a reabsorção óssea e promover a preservação da qualidade óssea.

Figura 4- Ilustração representativa da indução da perda óssea alveolar induzida e análise microtomográfica.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Legenda: A: Ilustração representativa da indução da perda óssea alveolar induzida pela colocação da ligadura ao redor do primeiro molar maxilar. B: Imagem clínica da maxila do camundongo imediatamente após a colocação das ligaduras bilaterais na maxila. C-D: Quantificação das medidas lineares na região vestibular e palatina, respectivamente. E-F: Quantificação da densidade mineral óssea e do volume ósseo entre os quatro grupos avaliados. Gráficos G-I são representativos das analises trabeculares, incluindo espessura, número e separação trabecular, respectivamente. J: Imagens bidimensionais radiográficas de todos os

grupos nas três orientações de estudo, dentre elas sagital, coronal e axial, e imagens tridimensionais reconstruídas na visão palatina e vestibular de todos os quatro grupos. Dados expressos como média ± desvio padrão. *p < 0,05; **p < 0,001; ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.2 Histologia Descritiva e Análise Estereométrica em Lâminas Coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E)

Para avaliar os efeitos anti-inflamatórios do tratamento com STS em um modelo de periodontite induzida por ligadura, realizamos análises histológicas descritivas, estereométricas e histomorfométricas em secções coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Para cada animal nos grupos experimentais, foram analisadas três secções histológicas com intervalos de pelo menos 100 µm, a fim de garantir uma representação abrangente do tecido a ser avaliado.

O exame histológico do grupo C revelou tecidos gengivais preenchendo o espaço interdental, com arquitetura bem organizada e papila interdental característica. A extensão apical do epitélio juncional (EJ) foi localizada próxima à junção cemento-esmalte (JCE), compatível com tecido periodontal saudável (Fig. 5). O tecido conjuntivo subjacente ao epitélio gengival apresentava feixes organizados de fibras colágenas, e a infiltração de células inflamatórias era mínima. De modo geral, o tecido apresentava integridade óssea preservada, conteúdo robusto de colágeno e baixa carga inflamatória, indicando homeostase normal.

Em contraste, o grupo P apresentou alterações histopatológicas acentuadas, compatíveis com inflamação aguda. Foi observada uma densa infiltração inflamatória ao redor dos locais de colocação da ligadura, marcada por um aumento substancial na infiltração de leucócitos, especialmente células polimorfonucleares. Essa resposta inflamatória foi acompanhada de desorganização e degradação da matriz colágena e evidente reabsorção óssea alveolar. O tecido conjuntivo estava gravemente comprometido, com acentuada redução na presença de fibroblastos e perda da integridade estrutural, características da destruição periodontal ativa.

Notavelmente, ambos os grupos tratados com STS (STS1 e STS5) demonstraram preservação da arquitetura do tecido periodontal. Em comparação ao grupo P, essas secções apresentaram redução significativa na infiltração de células inflamatórias, preservação do conteúdo de fibras colágenas e menor destruição óssea alveolar. As

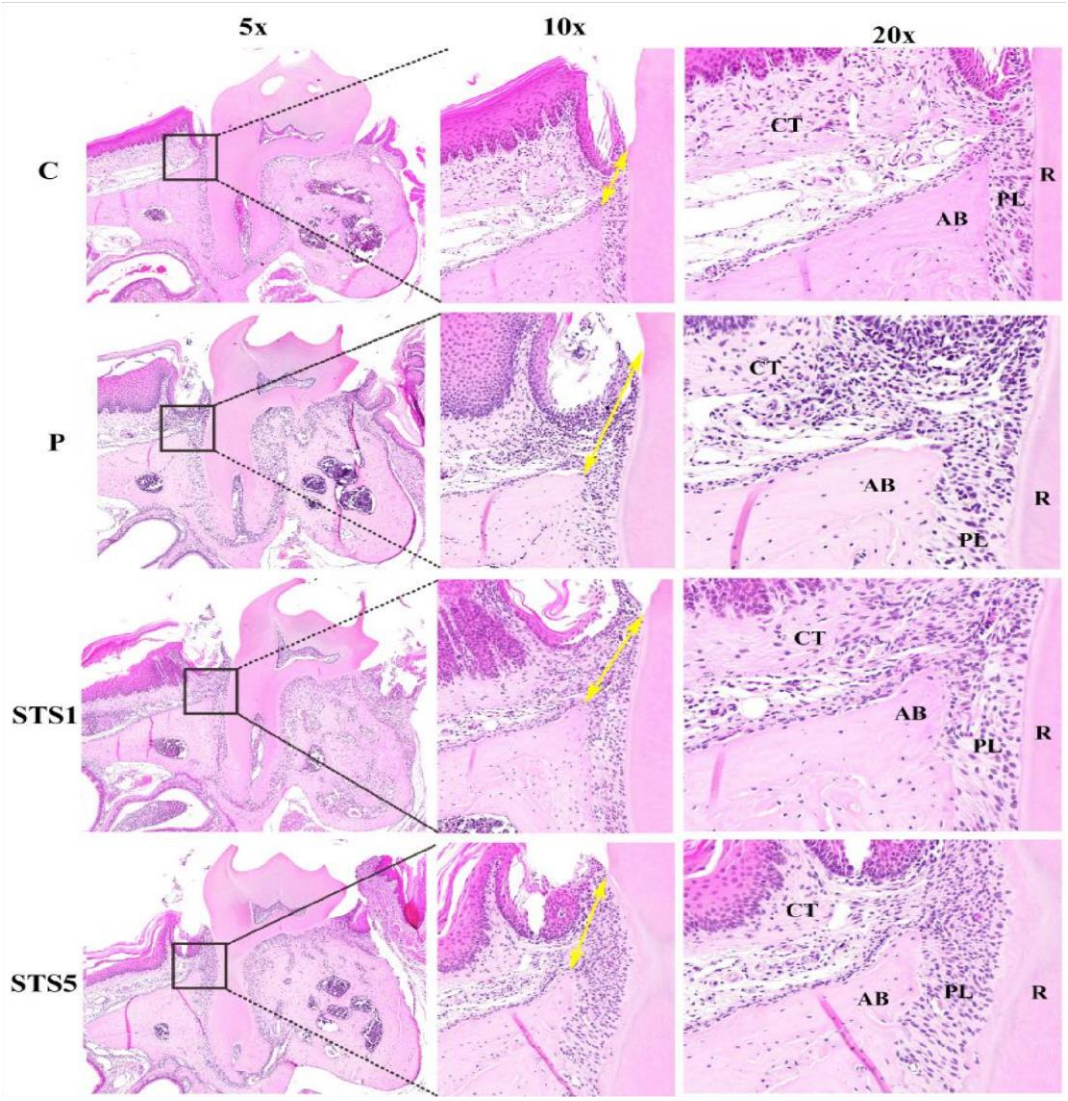
características histológicas sugerem que a tanshinona exerce efeitos anti-inflamatórios, limitando a gravidade da resposta inflamatória e mitigando o dano tecidual. É importante destacar que os tecidos dos grupos tratados com STS se assemelharam aos do grupo controle saudável, especialmente na organização do colágeno e na integridade epitelial, reforçando o papel protetor da tanshinona.

Para quantificar essas observações histológicas, foi realizada análise estereométrica dos componentes teciduais. Os parâmetros medidos incluíram a proporção de células inflamatórias, fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz extracelular e outros componentes estruturais (Fig. 6). Uma grade reticular de 10 × 5 (quadrados de 30 μm^2) foi sobreposta às secções coradas com H&E utilizando um software de edição de imagem para realizar a análise de contagem por pontos. A análise quantitativa confirmou que o grupo P apresentou uma porcentagem significativamente aumentada de células inflamatórias em comparação com todos os outros grupos, refletindo uma resposta imune inflamatória exacerbada ($p < 0,05$). O tratamento com STS, em ambas as dosagens, reduziu significativamente a proporção de células inflamatórias, confirmando sua ação anti-inflamatória. Além disso, o conteúdo de fibroblastos, marcador de reparo tecidual e manutenção da matriz, foi significativamente reduzido no grupo P. Em contraste, os tratamentos com STS1 e STS5 promoveram uma restauração notável do número de fibroblastos, sugerindo regeneração tecidual e estabilização da matriz conjuntiva. A porcentagem de vasos sanguíneos, frequentemente elevada em tecidos inflamados devido à angiogênese, foi significativamente aumentada no grupo P em comparação aos controles. O tratamento com STS levou a uma redução marcada na densidade vascular, aproximando-se dos níveis observados em tecidos saudáveis, indicando normalização do microambiente inflamatório. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas proporções de matriz extracelular e outras estruturas, sugerindo que as principais alterações estavam restritas aos componentes inflamatórios e celulares do tecido periodontal.

Esses resultados demonstram o potencial preventivo da STS na modulação do processo inflamatório, fornecendo evidências histológicas e quantitativas robustas de que o tratamento com tanshinona atenua significativamente a inflamação periodontal e protege contra a destruição tecidual e óssea. Ao reduzir a infiltração de células inflamatórias, preservar a arquitetura do colágeno, normalizar as respostas vasculares e promover a sobrevivência dos fibroblastos, a tanshinona demonstra um potencial

terapêutico multifacetado na gestão da periodontite. Suas propriedades combinadas antiinflamatórias e pró-regenerativas a tornam uma candidata promissora para investigação adicional como modalidade terapêutica em doenças periodontais e outras condições inflamatórias ósseas.

Figura 5- Análise histológica realizada com a coloração de hematoxilina e eosina.

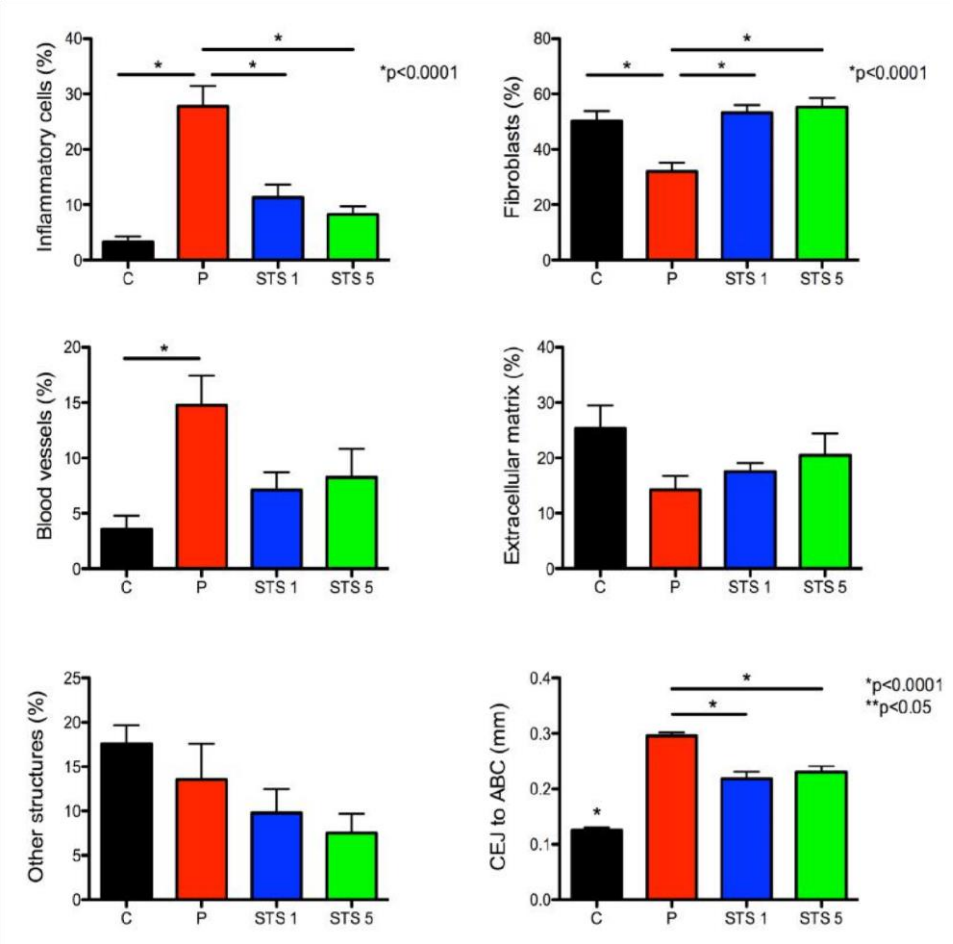


Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Legenda: Analise histológica realizada com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) em cortes vestíbulo-palatino, com destaque para a região palatina, onde as aplicações de tanshinona foram realizadas. Os resultados demonstram que os animais que foram tratados com ambas dosagens de STS demonstraram diminuição da distância entre a JCE e a COA, reduziram a quantidade de células inflamatórias e aumentaram o número de fibroblastos quando comparados com o grupo periodontite.

Para validar ainda mais os achados de micro-CT, foram realizadas medições histomorfométricas, avaliando especificamente a distância linear da JCE até a ABC. O grupo P apresentou aumento significativo da distância JCE-ABC, indicativo de perda tanto de tecido conjuntivo quanto de osso alveolar. De forma consistente com os dados de imagem, ambos os grupos tratados com STS apresentaram distâncias JCE-ABC reduzidas em comparação ao grupo P, embora aumentado em relação ao grupo controle, refletindo o efeito protetor da tanshinona (Fig. 6).

Figura 6- Quantificação dos achados histológicos realizados por meio de análise estereométrica semiquantitativa.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Legenda: Quantificação dos achados histológicos realizados por meio de análise estereométrica semiquantitativa. Os gráficos representam a porcentagem de células inflamatórias, fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz extracelular, outras estruturas. O gráfico no canto inferior direito representa os dados da analise histométrica, avaliando-se a distância entre a JCE a COA. Os resultados demonstram o potencial da STS em modular o processo inflamatório

e a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite induzida. Dados expressos como média ± desvio padrão. *p < 0,05; **p < 0,001; ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3 Análise de PicroSirius Red

A coloração com Picrosirius Red foi utilizada para avaliar a deposição e organização das fibras colágenas no tecido periodontal dos diferentes grupos experimentais. No grupo controle, observou-se uma intensa coloração avermelhada, indicativa de uma densa rede de fibras colágenas organizadas e bem estruturadas na região do tecido conjuntivo e ligamento periodontal. Essas fibras exibem birrefringência sob luz polarizada, característica de colágeno maduro e funcionalmente íntegro, refletindo a integridade do periodonto em animais saudáveis.

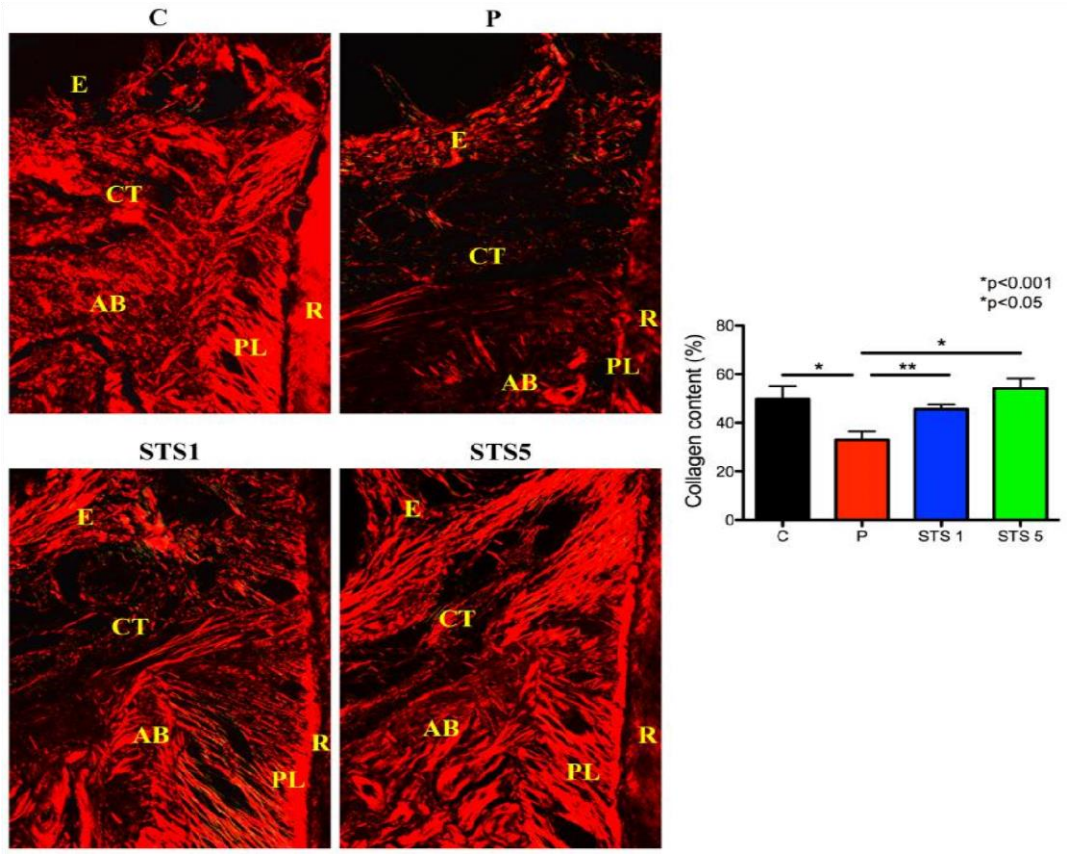
No grupo com periodontite (P), houve uma redução acentuada na intensidade da coloração por Picrosirius Red, sugerindo perda significativa da matriz colágena. As fibras colágenas remanescentes mostraram-se desorganizadas, fragmentadas e com menor birrefringência, o que é compatível com o processo de degradação tecidual decorrente da inflamação crônica induzida pela periodontite. Esse achado indica um comprometimento estrutural do tecido conjuntivo gengival, possivelmente associado à ativação de metaloproteinases e à intensa atividade osteoclástica.

Nos grupos tratados com Tanshinona IIA sulfonato de sódio, tanto STS1 quanto STS5, foi possível observar uma preservação parcial da rede colágena em comparação ao grupo com periodontite. Em STS1, a coloração por Picrosirius Red foi mais evidente do que no grupo P, com presença de fibras colágenas organizadas e maior birrefringência, sugerindo uma ação protetora da STS sobre a integridade do tecido conjuntivo. De forma semelhante, o grupo STS5 também apresentou uma recuperação evidente da matriz colágena, com fibras mais espessas, orientadas e birrefringentes sob luz polarizada, semelhante ao grupo C. A magnitude da preservação foi comparável ou ligeiramente superior à observada em STS1, sugerindo uma resposta terapêutica consistente e reprodutível à intervenção com STS.

Em conjunto, os resultados histológicos (picrosirius red) indicam que o tratamento com STS atenuou os efeitos destrutivos da periodontite sobre a matriz colágena gengival, promovendo a manutenção da arquitetura tecidual e possivelmente contribuindo para a resolução do processo inflamatório. A coloração por Picrosirius Red, portanto, evidencia

a ação antiinflamatória e antifibrinolítica do composto, sustentando seu potencial terapêutico na modulação da destruição tecidual associada à doença periodontal.

Figura 7- Análise do conteúdo colágeno em tecidos periodontais por coloração de Picrosirius red.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Legenda: Análise do conteúdo colágeno em tecidos periodontais por coloração de Picrosirius red. Imagens representativas das lâminas coradas com Picrosirius red sob luz polarizada demonstram a organização e quantidade de fibras colágenas nos grupos: controle (C), periodontite (P), e animais tratados com STS nas doses de 1 mg/kg (STS1) e 5 mg/kg (STS5). A coloração avermelhada indica fibras colágenas organizadas no tecido conjuntivo (CT), osso alveolar (AB), raiz (R), ligamento periodontal (PL) e epitélio (E). O grupo P apresentou evidente desorganização e redução das fibras colágenas em comparação ao grupo controle. O tratamento com STS promoveu preservação e recuperação do conteúdo colágeno tecidual. À direita, gráfico quantifica o conteúdo de colágeno (%) entre os grupos. Dados expressos como média ± desvio padrão. *p < 0,05; **p < 0,001; ANOVA seguida de teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada por um desequilíbrio persistente entre a carga inflamatória local e a capacidade de manutenção da homeostase tecidual, culminando na destruição progressiva dos tecidos de suporte dentário. Nesse contexto, a reabsorção óssea alveolar representa um dos principais desfechos patológicos da doença e está intimamente associada à ativação sustentada de vias imunoinflamatórias e osteoclastogênicas.[1,5,69-70] Os resultados do presente estudo demonstram que a aplicação local da tanshinona IIA sulfonato de sódio (STS) exerceu efeito preventivo significativo sobre a inflamação periodontal e a perda óssea alveolar em um modelo murino de periodontite induzida por ligadura.

A indução da periodontite por ligadura reproduziu de forma consistente os principais aspectos da doença periodontal ativa, incluindo aumento expressivo da distância JCE–COA, redução do volume ósseo e da densidade mineral óssea, além de deterioração da microarquitetura trabecular. Esses achados confirmam a robustez do modelo experimental utilizado e estão em consonância com estudos prévios que associam a inflamação sustentada à intensificação da atividade osteoclástica e à reabsorção óssea patológica.[59, 71-74] O tratamento com STS, em ambas as dosagens testadas, atenuou de forma significativa essas alterações, promovendo a preservação da altura óssea alveolar, do volume ósseo tridimensional e da qualidade estrutural do osso.

Destaca-se que os efeitos mais pronunciados da STS foram observados na região palatina, local de administração do fármaco, reforçando a importância da aplicação local e a natureza sítio-específica da intervenção. Esse achado é particularmente relevante no contexto da periodontite, uma doença localizada, na qual abordagens terapêuticas locais podem maximizar a eficácia clínica e minimizar efeitos sistêmicos indesejáveis. A preservação da densidade mineral óssea e dos parâmetros trabeculares sugere que a STS foi capaz de modular a atividade reabsortiva exacerbada associada à inflamação periodontal.

Em nível tecidual, as análises histológicas e estereométricas corroboraram os achados radiográficos. O grupo periodontite apresentou infiltrado inflamatório intenso, redução significativa do número de fibroblastos e aumento da densidade vascular, características compatíveis com um microambiente inflamatório ativo e destrutivo. Em

contraste, os grupos tratados com STS exibiram redução significativa da infiltração de células inflamatórias, restauração do conteúdo de fibroblastos e normalização dos perfis vasculares. Esses dados indicam que a STS promoveu um ambiente tecidual mais estável, favorecendo a manutenção da matriz conjuntiva e possivelmente os processos de reparo.

A angiogênese patológica e o acúmulo excessivo de leucócitos são reconhecidos como fatores-chave na perpetuação da inflamação periodontal e na degradação do tecido conjuntivo.[1,69,75] Assim, a redução da densidade vascular observada nos grupos tratados sugere atenuação da angiogênese inflamação-dependente e reforça a hipótese de que a STS contribui para a resolução do microambiente inflamatório. Esse efeito parece ocorrer de forma indireta, por meio da modulação de mediadores inflamatórios, e não por ação citotóxica direta sobre células vasculares ou inflamatórias.

A análise da matriz colágena por meio da coloração de Picrosirius Red forneceu evidências adicionais do efeito protetor da STS sobre o tecido conjuntivo periodontal. A periodontite induziu perda acentuada e desorganização das fibras colágenas, compatível com a intensa atividade proteolítica associada à inflamação crônica. Nos grupos tratados com STS, observou-se preservação parcial a significativa da rede colágena, com fibras mais organizadas e maior birrefringência sob luz polarizada. Esses achados indicam que a STS limita a degradação da matriz extracelular, provavelmente por meio da supressão indireta de mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas, como metaloproteinases e catepsinas, em vez de estimular diretamente a síntese de colágeno.

A análise histomorfométrica da distância JCE–COA confirmou os dados obtidos por microtomografia, demonstrando que os animais tratados com STS apresentaram menor perda óssea alveolar em comparação ao grupo periodontite, embora ainda não tenham atingido completamente os níveis observados no grupo controle. Esse resultado sugere que a STS atua principalmente como agente preventivo, reduzindo a progressão da destruição periodontal, mas não revertendo integralmente as alterações já estabelecidas no modelo utilizado.

De forma integrada, os achados deste estudo indicam que a tanshinona IIA sulfonato de sódio exerce efeitos anti-inflamatórios, antirreabsortivos e protetores sobre o tecido conjuntivo periodontal quando aplicada localmente. A modulação coordenada da inflamação, da remodelação óssea e da integridade da matriz extracelular posiciona

a STS como um composto promissor para estratégias de modulação do hospedeiro no tratamento da periodontite. Estudos futuros deverão aprofundar a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos e avaliar a eficácia da STS em modelos terapêuticos e translacionais mais próximos da prática clínica.

6 CONCLUSÃO

A aplicação local da tanshinona IIA sulfonato de sódio atenuou de forma significativa a inflamação periodontal e a perda óssea alveolar no modelo experimental de periodontite induzida por ligadura. Esses achados indicam que a STS apresenta potencial preventivo relevante, atuando na modulação do processo inflamatório e na preservação da integridade dos tecidos periodontais, nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17038.

2. Natto ZS, Abu Ahmad RH, Alsharif LT, et al. Chronic Periodontitis Case Definitions and Confounders in Periodontal Research: A Systematic Assessment. *Biomed Res Int* 2018;2018:4578782.

3. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* 2018;89 Suppl 1:S159-S172.

4. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809-1820.

5. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000* 2020;84:14-34.

6. Richards D. Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. *Evid Based Dent* 2014;15:70-71.

7. Becerra-Ruiz JS, Guerrero-Velazquez C, Martinez-Esquivias F, Martinez-Perez LA, Guzman-Flores JM. Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. *Oral Dis* 2021.

8. Cavalla F, Biguetti CC, Colavite PM, et al. TBX21-1993T/C (rs4794067) polymorphism is associated with increased risk of chronic periodontitis and increased T-bet expression in periodontal lesions, but does not significantly impact the IFN-g transcriptional level or the pattern of periodontophatic bacterial infection. *Virulence* 2015;6:293-304.

9. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:401-419.

10. Bhuvaneswarri J, Gita B, Chandrasekaran SC. Detection of rankl positive cells in gingival tissue in healthy & chronic periodontal disease patients-a comparative study. *J Clin Diagn Res* 2014;8:ZC31-34.

11. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.

12. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005;76:2033-2041.

13. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 2020;9.

14. Weivoda MM, Chew CK, Monroe DG, et al. Identification of osteoclast-osteoblast coupling factors in humans reveals links between bone and energy metabolism. *Nat Commun* 2020;11:87.

15. Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JI, Baylink DJ. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3204-3208.

16. Hathaway-Schrader JD, Novince CM. Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontol 2000* 2021;86:157-187.

17. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, et al. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol* 2020;47 Suppl 22:4-60.

18. Haas AN, Furlaneto F, Gaio EJ, et al. New tendencies in non-surgical periodontal therapy. *Braz Oral Res* 2021;35:e095.

19. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000* 2018;76:131-149.

20. Van Dyke TE. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2020;91 Suppl 1:S19-S25.

21. Curylofo-Zotti FA, Elburki MS, Oliveira PA, et al. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. *Arch Oral Biol* 2018;91:42-50.

22. Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced NF-kappa B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J Immunol* 2004;172:5940-5947.

23. Fernandes NAR, Camilli AC, Maldonado LAG, et al. Chalcone T4, a novel chalconic compound, inhibits inflammatory bone resorption in vivo and suppresses osteoclastogenesis in vitro. *J Periodontal Res* 2021;56:569-578.

24. Molez AM, do Nascimento EHL, Haiter Neto F, et al. Effect of resveratrol on the progression of experimental periodontitis in an ovariectomized rat model of osteoporosis: Morphometric, immune-enzymatic, and gene expression analysis. *J Periodontal Res* 2020;55:840-849.

25. Correa MG, Pires PR, Ribeiro FV, et al. Systemic treatment with resveratrol reduces the progression of experimental periodontitis and arthritis in rats. *PLoS One* 2018;13:e0204414.

26. Castro Dos Santos NC, Andere N, Araujo CF, et al. Omega-3 PUFA and aspirin as adjuncts to periodontal debridement in patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus: Randomized clinical trial. *J Periodontol* 2020;91:1318-1327.

27. Kruse AB, Kowalski CD, Leuthold S, Vach K, Ratka-Kruger P, Woelber JP. What is the impact of the adjunctive use of omega-3 fatty acids in the treatment of periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis* 2020;19:100.

28. Albuquerque-Souza E, Schulte F, Chen T, et al. Maresin-1 and Resolvin E1 Promote Regenerative Properties of Periodontal Ligament Stem Cells Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol* 2020;11:585530.

29. Shimabukuro N, Cataruci ACS, Ishikawa KH, et al. Bifidobacterium Strains Present Distinct Effects on the Control of Alveolar Bone Loss in a Periodontitis Experimental Model. *Front Pharmacol* 2021;12:713595.

30. Silva GA, Moreira ALG, Silva PHF, et al. The use of probiotics can reduce the severity of experimental periodontitis in rats with metabolic syndrome: an immunoenzymatic and microtomographic study. *J Periodontol* 2021.

31. Morales A, Gandolfo A, Bravo J, et al. Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up. *J Appl Oral Sci* 2018;26:e20170075.

32. Da Ponte Leguizamon N, de Molon RS, Coletto-Nunes G, et al. Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *J Dent Res* 2021:220345211027811.

33. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *J Dent Res* 2021;100:798-809.

34. Dong Y, Morris-Natschke SL, Lee KH. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep* 2011;28:529-542.

35. Chen X, Guo J, Bao J, Lu J, Wang Y. The anticancer properties of Salvia miltiorrhiza Bunge (Danshen): a systematic review. *Med Res Rev* 2014;34:768-794.

36. Panwar P, Xue L, Soe K, et al. An Ectosteric Inhibitor of Cathepsin K Inhibits Bone Resorption in Ovariectomized Mice. *J Bone Miner Res* 2017;32:2415-2430.

37. Ren ZH, Tong YH, Xu W, Ma J, Chen Y. Tanshinone II A attenuates inflammatory responses of rats with myocardial infarction by reducing MCP-1 expression. *Phytomedicine* 2010;17:212-218.

38. Li X, Lian LH, Bai T, et al. Cryptotanshinone inhibits LPS-induced proinflammatory mediators via TLR4 and TAK1 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2011;11:1871-1876.

39. Li XX, Zheng X, Liu Z, et al. Cryptotanshinone from Salvia miltiorrhiza Bunge (Danshen) inhibited inflammatory responses via TLR4/MyD88 signaling pathway. *Chin Med* 2020;15:20.

40. Jang SI, Kim HJ, Kim YJ, Jeong SI, You YO. Tanshinone IIA inhibits LPS-induced NF-kappaB activation in RAW 264.7 cells: possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways. *Eur J Pharmacol* 2006;542:1-7.

41. Ekeuku SO, Pang KL, Chin KY. The Skeletal Effects of Tanshinones: A Review. *Molecules* 2021;26.

42. Liu X, Niu Y, Xie W, Wei D, Du Q. Tanshinone IIA promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK1/2-dependent Runx2 induction. *Am J Transl Res* 2019;11:340-350.

43. Qian K, Xu H, Dai T, Shi K. Effects of Tanshinone IIA on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2015;388:1201-1209.

44. Kim HH, Kim JH, Kwak HB, et al. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by tanshinone IIA isolated from Salvia miltiorrhiza Bunge. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1647-1656.

45. Cheng L, Zhou S, Zhao Y, et al. Tanshinone IIA attenuates osteoclastogenesis in ovariectomized mice by inactivating NF-kB and Akt signaling pathways. *Am J Transl Res* 2018;10:1457-1468.

46. Kwak HB, Sun HM, Ha H, et al. Tanshinone IIA suppresses inflammatory bone loss by inhibiting the synthesis of prostaglandin E2 in osteoblasts. *Eur J Pharmacol* 2008;601:30-37.

47. Mandelin J, Hukkanen M, Li TF, et al. Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone* 2006;38:769-777.

48. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998;273:32347-32352.

49. Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res Notes* 2015;8:322.

50. Kafienah W, Bromme D, Buttle 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 (Pt 3):727-732.

51. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* 1996;271:12517-12524.

52. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocr Rev* 2017;38:325-350.

53. Dai R, Wu Z, Chu HY, et al. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:433.

54. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 2005;11:76-81.

55. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig* 2016;20:1203-1216.

56. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol* 2014;85:465-477.

57. de Molon RS. Therapeutic Potential of Tanshinones in Osteolytic Diseases: From Molecular and Cellular Pathways to Preclinical Models. *Dent J (Basel)* 2025;13.

58. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig* 2016;20:1203–1216.

59. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech* 2018;81:1412–1421.

60. de Molon RS, Vernal R, Oliveira GE, et al. Inflammatory bone loss and signaling pathways in periodontitis: mechanistic insights and emerging therapeutic strategies. *Bone Res* 2026;14:1.

61. Panwar P, Andrault PM, Saha D, Bromme D. Immune regulatory and anti-resorptive activities of tanshinone IIA sulfonate attenuates rheumatoid arthritis in mice. *Br J Pharmacol* 2024;181:5009–5027.

62. Panwar P, Law S, Jamroz A, et al. Tanshinones that selectively block the collagenase activity of cathepsin K provide a novel class of ectosteric antiresorptive agents for bone. *Br J Pharmacol* 2018;175:902–923.

63. Panwar P, Soe K, Guido RV, Bueno RV, Delaisse JM, Bromme D. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. *Br J Pharmacol* 2016;173:396–410.

64. Nogueira AV, de Molon RS, Nokhbehsaim M, Deschner J, Cirelli JA. Contribution of biomechanical forces to inflammation-induced bone resorption. *J Clin Periodontol* 2017;44:31–41.

65. Souza JAC, Magalhaes FAC, Oliveira G, RS DEM, Zuanon JA, Souza PPC. Pam2CSK4 (TLR2 agonist) induces periodontal destruction in mice. *Braz Oral Res* 2020;34:e012.

66. Pavanelli ALR, Vieira SM, Marcantonio CC, et al. Anti-inflammatory and antiresorptive activities of tanshinone-IIA mitigate alveolar bone destruction in mice with experimental periodontitis. *J Periodontol* 2025.

67. Kinoshita M, Yamada S, Sasaki J, et al. Mice Lacking PLAP-1/Asporin Show Alteration of Periodontal Ligament Structures and Acceleration of Bone Loss in Periodontitis. *Int J Mol Sci* 2023;24.

68. Santinoni CS, Silveira FM, Caldeira ML, et al. Topical sodium alendronate combined or not with photodynamic therapy as an adjunct to scaling and root planing: Histochemical and immunohistochemical study in rats. *J Periodontal Res* 2020;55:850–858.

69. Baima G, Arce M, Romandini M, Van Dyke T. Inflammatory and Immunological Basis of Periodontal Diseases. *J Periodontal Res* 2025.

70. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat Rev Immunol* 2021;21:426–440.

71. de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *J Investig Clin Dent* 2013;4:211–218.

72. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35:89–105.

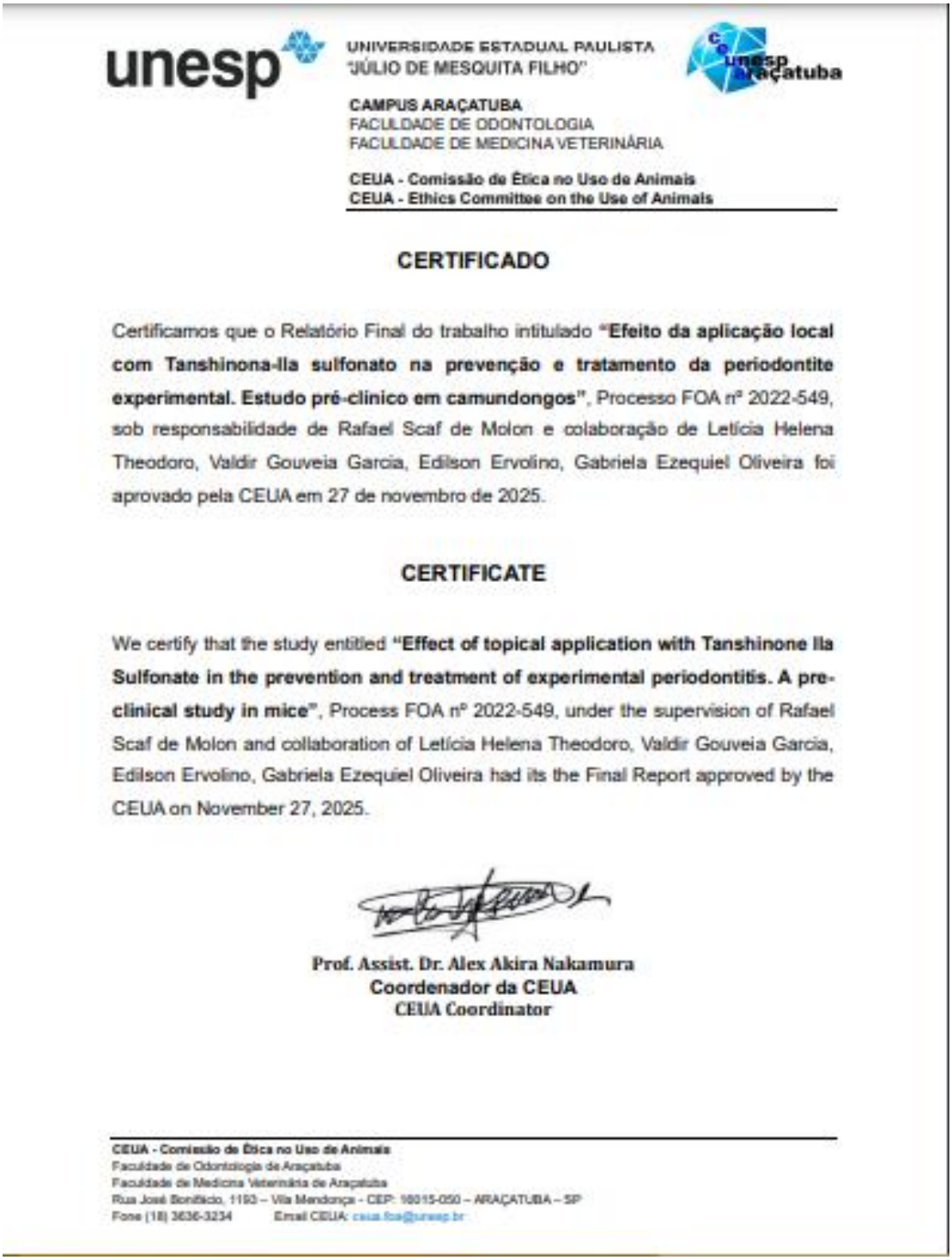
73. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol* 2012;15:117–132.

74. Hajishengallis G, Lamont RJ, Graves DT. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence* 2015;6:229–235.

75. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000* 2017;75:317–329.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FOA/UNESP)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado **"Efeito da aplicação local com Tanshinona-IIa sulfonato na prevenção e tratamento da periodontite experimental. Estudo pré-clínico em camundongos"**, Processo FOA nº 2022-549, sob responsabilidade de Rafael Scaf de Molon e colaboração de Letícia Helena Theodoro, Valdir Gouveia Garcia, Edilson Ervolino, Gabriela Ezequiel Oliveira foi aprovado pela CEUA em 27 de novembro de 2025.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of topical application with Tanshinone IIa Sulfonate in the prevention and treatment of experimental periodontitis. A pre-clinical study in mice"**, Process FOA nº 2022-549, under the supervision of Rafael Scaf de Molon and collaboration of Letícia Helena Theodoro, Valdir Gouveia Garcia, Edilson Ervolino, Gabriela Ezequiel Oliveira had its the Final Report approved by the CEUA on November 27, 2025.

Prof. Assist. Dr. Alex Akira Nakamura
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br