



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



Sâmmea Martins Vieira

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

Araraquara

2022



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



Sâmmea Martins Vieira

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

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

Orientador: Gisele Faria

Araraquara

2022

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

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

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

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Sâmmea Martins Vieira

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

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Gisele Faria

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

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri

Araraquara, 25 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Sâmmea Martins Vieira

NASCIMENTO: 04 de março de 1995 – Oeiras – Piauí

FILIAÇÃO: Raimundo Sérgio de Lima Vieira
Laurinete Martins Vieira

2013 - 2018: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade Integral Diferencial – FACID, Teresina-PI

2020 - 2022: Mestrado em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2021 - Atual: Especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB – USP)

DEDICO ESTE TRABALHO

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

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

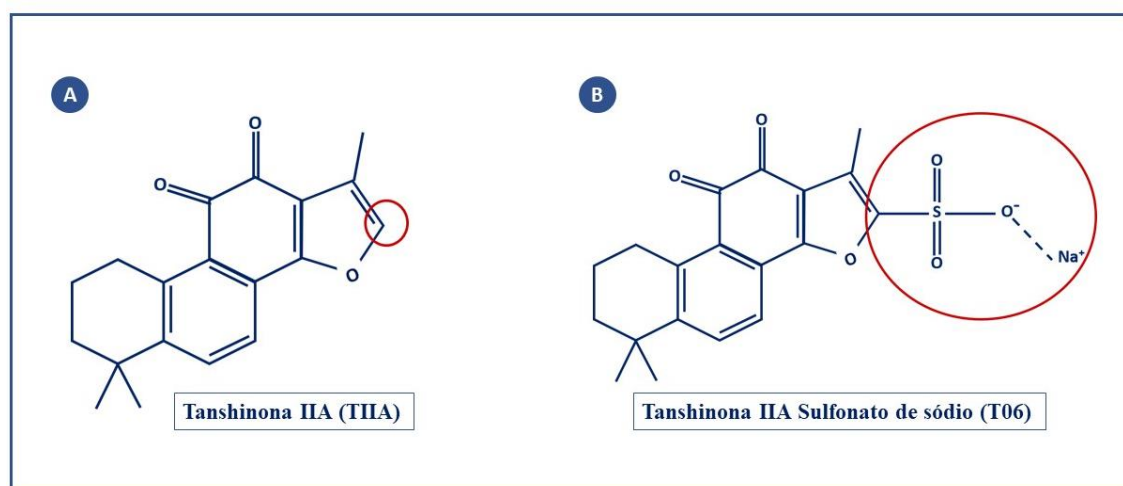
É importante salientar que diferentemente dos antirreabsortivos como estrogênio, bifosfonatos e Denosumabe, que reduzem a população de osteoclastos, a TIIA não exerce somente esse efeito. Ela reduz a osteoclastogênese, mas também induz a formação óssea⁵⁹. Outro potencial efeito da TIIA seria a inibição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

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

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

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

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



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

Fonte: Zhou et al.⁵⁵

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das TIIA e T06 sobre a destruição óssea em periodontite apical induzida experimentalmente em dentes de camundongos, por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT). A hipótese testada foi que a lesão periapical seria menor nos animais que recebessem o tratamento com TIIA ou T06, em comparação com os animais que não recebessem o referido tratamento.

3 PUBLICAÇÃO¹

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

3.1 RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da tanshinona IIA (TIIA) e tanshinona IIA sulfonato de sódio (T06) sobre a destruição óssea em periodontite apical (PA) induzida em camundongos.

Métodos: Foram utilizados 40 camundongos *wild-type* da linhagem C57BL/6, machos, com 8 semanas. Após abertura coronária, a polpa dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo de 30 animais foi removida/desorganizada, e a câmara pulpar foi deixada aberta ao ambiente bucal para contaminação e formação da lesão periapical, por um período de 10 dias. Os camundongos foram distribuídos em 4 grupos (n=10/grupo): Grupo com indução de PA e tratamento com TIIA (40 mg/Kg/dia); Grupo com indução de PA e tratamento com T06 (40 mg/Kg/dia); Grupo com indução de PA e tratamento com veículo (água destilada); e Grupo sem indução da PA e sem intervenção terapêutica. As substâncias foram administradas por gavagem, uma vez ao dia, durante os 10 dias do experimento. Após eutanásia, uma hemi-mandíbula foi fixada em paraformaldeído e submetida ao exame em microtomógrafo para análise volume do espaço periapical.

Resultados: O volume do espaço periapical (mm³) nos grupos que receberam indução da PA e tratamentos com TIIA, T06 e água foi maior do que no grupo controle – sem indução de PA ($p < 0,0001$), denotando a formação da lesão periapical naqueles. Não houve diferença estatisticamente significativa no volume da lesão periapical entre os grupos que receberam tratamentos com TIIA, T06 e água ($p > 0,05$).

Conclusão: Concluiu-se que as tanshinonas IIA e 06, administradas por 10 dias, não tiveram efeito na destruição óssea em periodontite apical induzida em camundongos.

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

¹ Este item está escrito na forma de artigo.

* 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>

3.2 INTRODUÇÃO

Metade da população adulta mundial tem pelo menos um dente com periodontite apical¹. A periodontite apical é causada pela infecção do sistema de canais radiculares² e se caracteriza pela presença de inflamação e destruição de tecidos mineralizados e não mineralizados perirradiculares^{3,4}.

Os micro-organismos e seus componentes antigênicos estimulam as células do infiltrado inflamatório, principalmente os macrófagos, a produzirem interleucina (IL) - 1, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-6, que são considerados mediadores primários e principais reguladores da osteoclastogênese⁵. A via molecular de modulação da osteoclastogênese é composta pelo sistema receptor ativador do fator nuclear-kappaB - NF-κB - (RANK), seu ligante solúvel (RANKL) e pela osteoprotegerina (OPG). O RANKL é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), secretado por osteoblastos, células T e células B ao serem ativados por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF. O RANKL ativa a diferenciação em osteoclastos ao ligar-se ao RANK expresso na superfície celular de seus precursores. A OPG é um receptor solúvel que, ao se ligar ao RANKL, impede a sua ligação ao seu receptor RANK e inibe a diferenciação de osteoclastos⁶. A solubilização do componente mineral inorgânico ocorre devido à produção e bombeamento de prótons pelos osteoclastos, que tornam o microambiente ácido⁷. A degradação de componentes orgânicos do tecido mineralizado é realizada por enzimas líticas, dentre elas as metaloproteinases da matriz (MMPs) e as cisteíno proteases, como a catepsina K – CatK^{4,8}.

Para controlar a periodontite apical, é necessário regular a síntese dos mediadores inflamatórios e a osteoclastogênese³, o que é conseguido por meio controle de infecção proporcionado pelo tratamento endodôntico⁹. Por outro lado, estudos pré-clínicos com medicamentos para controle de osteoporose têm mostrado que inibidores de CatK, como o medicamento experimental Odanacatib, e inibidores da osteoclastogênese, como os bisfosfonatos, podem controlar a inflamação e a destruição óssea em periodontite apical¹⁰⁻¹³. No entanto, o Odanacatib levou a efeitos adversos como risco aumentado de acidente vascular cerebral¹⁴, e os bisfosfonatos elevam o risco de osteonecrose¹⁵. Apesar dos efeitos adversos, os referidos medicamentos foram eficazes no controle da destruição óssea, o que abre caminho para o avanço em pesquisas sobre o efeito de medicamentos, com ação semelhante,

como possíveis agentes moduladores do hospedeiro em condições inflamatórias e infecciosas como a periodontite apical.

As tanshinonas, compostos extraídos da raiz seca da planta medicinal *Salvia miltiorrhiza*¹⁶, são usadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças cardiovasculares¹⁷, e doenças ósseas líticas, como artrite e osteoporose¹⁸, entre outras. Dentre os vários tipos de tanshinonas, destacam-se a tanshinona IIA (TIIA) e a tanshinona IIA sulfonato de sódio (T06) que é um derivado solúvel da TIIA. A TIIA é eficaz na inibição da osteoclastogênese / reabsorção óssea e na promoção da osteoblastogênese / formação óssea¹⁸. A T06 inibe a perda óssea via inibição seletiva da atividade collagenolítica da CatK, efeito esse que recebeu o nome de inibição ectostérica de CatK¹⁹. Além disso, ambos compostos apresentam atividade anti-inflamatória, que ocorre por meio da regulação de fatores de transcrição, como NF- κ B^{16,20}, entre outros mecanismos. Por essas razões, as TIIA e T06, substâncias de origem natural, podem ser candidatas para auxiliar no controle da perda óssea da periodontite apical.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das TIIA e T06 sobre a destruição óssea em periodontite apical induzida experimentalmente em dentes de camundongos por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT).

3.3 MATERIAL E MÉTODO

Preparo das tanshinonas

A TIIA (Sigma Aldrich, 51704; St. Louis, MO, USA) foi preparada na concentração 5 mg/mL, utilizando polissorbato 20, também denominado Tween 20, (15 % volume/volume) (v/v)²¹, etanol (2 % v/v) e água destilada. A mistura foi homogeneizada em agitador vórtex a 2800 Rpm (Kasvi, K45-2820, Ouro Fino, PR, Brasil) e mantida em banho ultrassônico por 10 minutos. A T06 (Sigma Aldrich, 2517) foi preparada a 5 mg/mL com água destilada aquecida a 40 °C e homogeneizada por 3 minutos no agitador vortex. As tanshinonas foram preparadas diariamente e administradas nos animais via gavagem (200 μ l/animal), na dose de 40mg/Kg¹⁹, uma vez ao dia, durante 10 dias.

Animais

A estimativa do tamanho da amostra necessária para o estudo do volume da lesão periapical foi calculado usando o software G * Power 3.1 para Windows (Franz Faul, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Alemanha). O cálculo, baseado em um tamanho de efeito = 0,64, [com base no estudo de Hao et al.¹⁰ e em resultados do nosso grupo de pesquisa sobre volume de lesão periapical em dentes de camundongos], poder de teste (β) = 0,8 e α = 0,05, usando "família de teste F" (ANOVA one-way), mostrou serem necessários 8 espécimes por grupo, em cada um dos períodos experimentais. No entanto, como perdas podem ocorrer durante o procedimento, por meio da anestesia ou ato operatório (fatura ou perfuração de dente), fizemos a previsão de 10 espécimes por grupo.

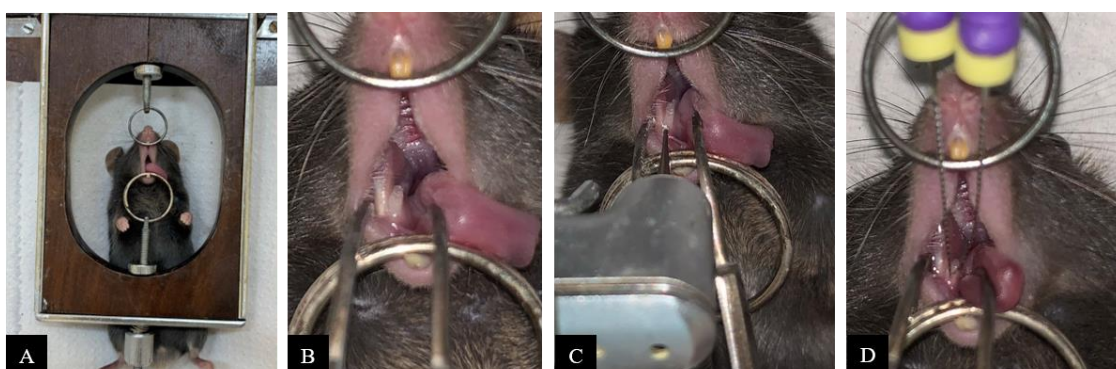
Após aprovação do projeto de pesquisa (Proc. CEUA nº 19/2020) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (ANEXO A), foram utilizados 40 camundongos *wild-type* (WT) da linhagem C57BL/6, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 23 gramas, provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA), do Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu (IBTEC). Os camundongos foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 x 20 cm (4 a 6 animais por gaiola), forradas com cama de maravalha, em temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água.

Indução da periodontite apical e tratamento dos animais

Periodontite apical foi induzida nos primeiros molares inferiores dos lados direito e esquerdo de camundongos *wild-type* C57BL/6. Para a realização dos procedimentos operatórios os animais foram anestesiados com ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP), na dosagem de 1 mL/Kg de peso do animal, e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), na dosagem de 0,5 mL/Kg de peso do animal, via intraperitoneal. Em seguida, os camundongos foram devidamente posicionados em mesa cirúrgica específica para a realização de procedimentos odontológicos, permitindo sua imobilização e manutenção da boca aberta, para acesso aos primeiros

molares inferiores. A abertura coronária dos primeiros molares inferiores foi realizada pela face oclusal, com broca esférica de aço inoxidável (n° 1/4 - KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP), montada em motor elétrico (Endo Pro Torque 6000 RPM, 45315991; Driller, SP, Brasil). Em seguida, os canais radiculares foram localizados e explorados com uma lima do tipo Kerr 10 (Maillefer Dentsply Sirona, York, Pensilvânia) para remoção ou desorganização da polpa radicular⁴ (Figura 2).

Figura 2 – Indução da periodontite apical no primeiro molar inferior de camundongos *wild-type* da linhagem C57BL/6



(A) Posicionamento do camundongo na mesa cirúrgica específica para procedimentos odontológicos. (B) Visualização dos molares inferiores do lado direito, o que é possível pelo afastamento da língua e bochecha com uma pinça clínica. (C) Posicionamento do motor e da fresa esférica junto ao primeiro molar inferior. (D) Localização dos canais mesial e distal com o auxílio de limas tipo K #10.

Fonte: Elaboração própria.

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=10/grupo) de acordo com a tabela 1: Grupo sem indução da PA e sem intervenção terapêutica; Grupo com indução de PA e tratamento com TIIA (40 mg/Kg/dia); Grupo com indução de PA e tratamento com T06 (40 mg/Kg/dia); e Grupo com indução de PA e tratamento com veículo (água destilada). O tratamento com as tanshinonas e veículo foi iniciado no mesmo dia da abertura coronária e foi mantido por 10 dias, sendo a administração realizada por gavagem, uma vez ao dia, durante os 10 dias de duração do experimento. A via de administração e dosagem das tanshinonas foi baseada em estudo anterior¹⁹.

Tabela 1 - Descrição da distribuição de grupos, tratamento e número de animais

Grupos	Especificação de cada grupo	Quantidade de Animais
Grupo Controle	Sem indução de periodontite apical (PA) e sem tratamento	10
Grupo PA + TIIA	Com indução de PA e tratamento com tanshinona IIA	10
Grupo PA + T06	Com indução de PA e tratamento com tanshinona 06	10
Grupo PA + água	Com indução de PA e tratamento com veículo (água)	10

Fonte: Elaboração própria

Após o período de 10 dias de indução da periodontite apical, os animais foram submetidos à eutanásia com sobre dose anestésica com Quetamina (180mg/kg) e Xilazina (30mg/kg) por via intraperitoneal, de acordo pelo Guia de Eutanásia para animais de ensino e pesquisa emitido pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP²², sendo que os métodos de confirmação da morte do animal seguiram o guia brasileiro de boas práticas para eutanásia com animais que consistem na: ausência de movimentos torácicos e sinais de respiração. Após a eutanásia, as mandíbulas foram removidas com tesoura cirúrgica, dissecadas com auxílio de alicate e separadas em hemi-mandíbulas direita e esquerda. Uma hemi-mandíbula foi fixada por imersão em formaldeído 4% tamponado por 48 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, os espécimes foram lavados e colocados em solução de álcool 70 % para a realização do escaneamento em microtomógrafo.

Microtomografia computadorizada (micro-CT)

As hemi-mandíbulas foram escaneadas em microtomógrafo SkyScan (Skyscan 1176 in vivo, Kontich, Bélgica). Para a seleção dos parâmetros de aquisição foi tomado como base estudo do nosso grupo de pesquisa²³ e o manual do microtomógrafo que indica o uso de filtro de alumínio de 0,5mm e voxel de 18µm para tecidos ósseos de camundongos. Por consequência a kilovoltagem (kV), a amperagem e o tempo de exposição foram 50kV, 500µA e 300ms respectivamente (padronização do aparelho). Foram usados rotação de 180°, frame de 3 e passos de rotação de 0,5°. Em seguida, as imagens foram transportadas para o programa NRecon v.1.6.6.0 (Skyscan) e

reconstruídas usando parâmetros de *smoothing* (0%), *beam-hardening correction* (2%), *ring artifact reduction* (2%) e *gray dataset* (0.010 – 0.113). Esses valores foram definidos utilizando a ferramenta "*fine turning*" que permite avaliar cada valor dos parâmetros de reconstrução possibilitando a seleção da imagem com menor quantidade de ruídos/ artefatos. No programa Dataviewer (Skyscan), as imagens foram orientadas nos planos coronal, axial e sagital. Estas orientações foram realizadas seguindo os eixos X (linha azul), Y (linha verde) e Z (linha vermelha). Para obter a orientação padrão no plano sagital, a abertura cervical do canal distal do primeiro molar inferior e forame apical foram alinhados com o eixo X, enquanto no plano coronal, o longo eixo da raiz distal foi alinhado paralelamente ao eixo Z. No plano axial, os canais radiculares mesial e distal do primeiro molar foram alinhados com o eixo Z, mantendo os dois canais paralelos a ele. O eixo Y não foi usado para orientação. Independentemente da orientação, os planos coronal, sagital e axial foram mantidos perpendiculares um ao outro²³. Depois de orientadas, as imagens do plano sagital foram salvas e transportadas para o programa CTAn (Skyscan) para análise do espaço periapical na raiz distal do primeiro molar inferior. Foram selecionados os cortes microtomográficos da extensão de toda a lesão periapical envolvendo a raiz (média de número de cortes por espécime = 25). Não foram utilizados cortes que não mostraram estrutura radicular, pois a área radiolúcida sem a presença da raiz como referencial poderia ser confundida com ligamento periodontal. No programa CTAn (Skyscan) foi utilizada a ferramenta "COLOR" para facilitar a visualização e delimitação da margem da lesão periapical/espço periapical por meio do ROI (região de interesse) personalizado. Foram utilizados os valores de *threshold* de 0 e 45 pois foi utilizado o ROI personalizado. O valor do volume do espaço periapical em mm³ foi anotado²³. Todas as medidas foram realizadas por um examinador experiente que não possuía informações prévias de identificação dos grupos avaliados.

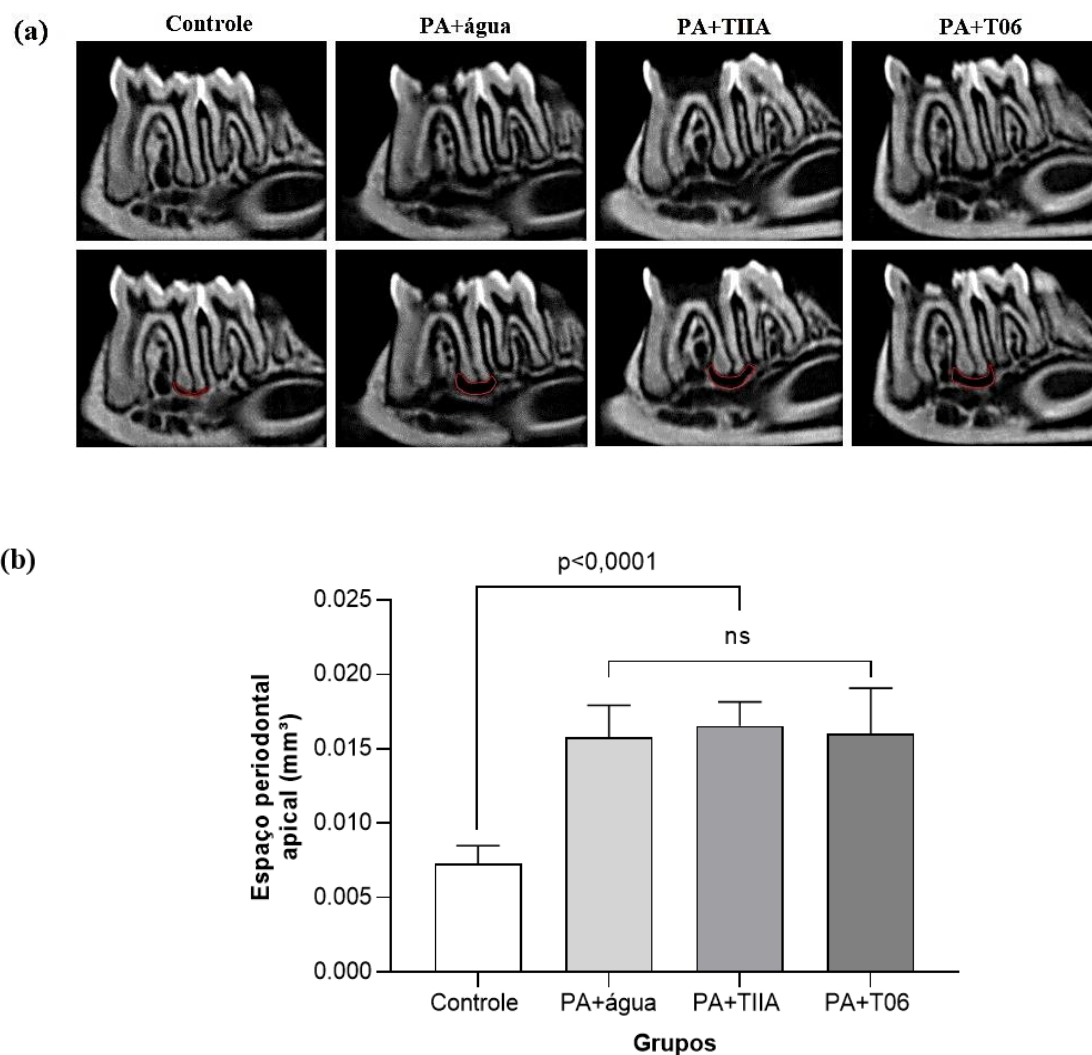
Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA.), com nível de significância de 5%. Como apresentaram distribuição normal, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e homogeneidade das variâncias, constatada pelo teste de Bartlett, os dados foram comparados empregando análise de variância (ANOVA) de uma via e pós-teste de Tukey.

3.4 RESULTADOS

No grupo controle foi observada integridade da lâmina dura, com ausência de reabsorção óssea periapical e espessura normal do espaço do ligamento periodontal na raiz distal dos primeiros molares inferiores. Nos grupos PA+água, PA+TIIA e PA+T06 houve formação da lesão periapical, evidenciada pela presença de reabsorção óssea periapical na raiz distal (Figura 3a). No presente estudo, após 10 dias de aplicação do protocolo, foi observada a formação de lesão periapical. O volume do espaço periapical (mm^3), no grupo que recebeu indução da lesão periapical e tratamento com água (PA+água), teve um tamanho médio de $0,0157 \text{ mm}^3$, o que representa um volume 118% maior do que o espaço periapical do grupo controle, sem indução da lesão periapical ($0,0072 \text{ mm}^3$). O volume do espaço periapical (mm^3) nos grupos que receberam indução da periodontite apical e tratamento com água ou tanshinonas (PA+água, PA+TIIA e PA+T06) foi maior que no grupo controle – sem indução da periodontite apical ($p < 0,0001$), denotando a formação da lesão periapical naqueles. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa no volume da lesão periapical entre os grupos que receberam tratamentos com água, TIIA e T06 por 10 dias ($p > 0,05$), conforme mostrado na figura 3b.

Figura 3 - Análise por microtomografia computadorizada (micro-CT) da lesão periapical da raiz distal de primeiros molares inferiores de camundongos *Wild type* C57BL/6.



(a) Na 1ª linha, imagens representativas do grupo controle (sem indução de lesão periapical), e dos grupos com indução de lesão periapical e que receberam tratamento com água (PA+água), tanshinona TIIA (PA+TIIA) ou tanshinona T06 (PA+T06) por 10 dias. Na 2ª linha, o espaço periapical da raiz distal dos primeiros molares está delimitado em vermelho. (b) Comparação do volume do espaço periapical da raiz distal dos primeiros molares inferiores. ns = diferença não estatisticamente significativa.

Fonte: Elaboração própria.

3.5 DISCUSSÃO

A hipótese testada neste estudo foi que o volume da lesão periapical, avaliado em micro-CT, seria menor nos animais que recebessem o tratamento com TIIA ou T06, em comparação com os animais que não recebessem o referido tratamento. A hipótese foi rejeitada, pois não houve diferença estatisticamente significativa no volume da lesão periapical dos animais que receberam TIIA e T06 em comparação com o grupo que recebeu o veículo (água).

Lesão periapical é uma condição osteolítica decorrente da infecção do sistema de canais radiculares, em que uma resposta imune-inflamatória medeia a destruição do osso alveolar²⁴. A micro-CT é uma importante ferramenta para pesquisas envolvendo lesão periapical em animais de pequeno porte^{23,25}. Ela apresenta alta resolução de imagem²⁶ e permite avaliação da lesão periapical em diferentes planos: coronal, sagital e axial^{23,25}. Também fornece imagens 2D (bidimensionais) e 3D (tridimensionais) das mesmas amostras²³, e é um método rápido, reprodutível e não invasivo²⁷. Além disso, as imagens microtomográficas podem ser utilizadas para avaliar a destruição óssea periapical com precisão equivalente àquela atingida pelo padrão ouro dos cortes histológicos²⁷, servindo assim, como grande aliada para as pesquisas em animais de pequeno porte²⁸.

De acordo com revisão sistemática de literatura, não há protocolo definido para aquisição e análise de imagens de micro-CT de lesões periapicais em ratos e camundongos. Além disso, os parâmetros de aquisição, reconstrução e análise não são relatados adequadamente nas pesquisas que avaliam a lesão periapical por meio de micro-CT, o que pode comprometer a reprodução e o impacto científico dos estudos²³. Neste estudo, empregamos os parâmetros de aquisição com base na referida revisão de literatura²³ e no manual do microtomógrafo que indica o uso de filtro de alumínio de 0,5mm e voxel de 18µm para tecidos ósseos de camundongos. Também informamos todos os parâmetros utilizados na reconstrução e análise das lesões periapicais.

O modelo de indução de lesão periapical empregado consistiu de abertura coronária, extirpação/desorganização da polpa radicular e exposição dos canais radiculares ao meio bucal para contaminação por micro-organismos. Esse modelo clássico tem sido amplamente empregado em pesquisas para indução de lesão periapical em ratos e camundongos^{4,11,29,30}. Há pequenas variações desse protocolo; alguns pesquisadores efetuam apenas abertura coronária^{31,32}, enquanto outros

realizam abertura coronária, seguido da remoção ou não da polpa radicular e inoculação, na câmara pulpar, de bactérias relacionadas a infecção endodôntica^{8,10,33,36}.

Há duas fases distintas no desenvolvimento da lesão periapical em animais de pequeno porte: uma fase ativa ou de progressão, em que ocorre o desenvolvimento e crescimento da lesão periapical, e uma fase de estabilidade, na qual há aumentos não significativos ou nenhuma alteração do seu tamanho^{4,33,34}. Análises histomorfométricas da cinética de desenvolvimento da lesão periapical em camundongos C57Bl/6 (*wild type*) mostraram desenvolvimento da lesão periapical de 3 para 14 dias e ausência de aumento significativo de 14 a 21 dias³³, ou, ainda, uma fase ativa de 0 a 7 dias e uma fase de estabilização de 7 a 14 e de 14 a 21 dias³⁴. Estudo avaliando a área da lesão periapical induzida em camundongos C57BL/6, por meio de micro-CT, revelou que não houve perda óssea significativa aos 7 dias, mas que esta ocorreu de 7 para 14 dias, com aumento de 83%; de 14 a 21 e 21 a 42 não houve aumento da lesão⁴. Assim, escolhemos o tempo de avaliação de 10 dias por ser um período em que há formação da lesão. Do ponto de vista celular e molecular, evidências de estudos clínicos e pré-clínicos de lesões periapicais apontam para um alto valor da relação RANKL/OPG como o principal determinante da atividade osteolítica, enquanto uma baixa relação RANKL/OPG é frequentemente observada em lesões inativas. As citocinas pró-inflamatórias modulam diretamente a expressão de RANKL/OPG e, conseqüentemente, conduzem a progressão da lesão, junto de um suporte pró-osteoclastogênico fornecido pelas células Th1, Th17 e B. Esse período progressivo é então seguido por uma estabilidade do influxo de células inflamatórias, com parada da atividade de reabsorção óssea e uma baixa relação RANKL/OPG²⁴.

Considerando a patogênese da lesão periapical, agentes moduladores da resposta do hospedeiro como as tanshinonas, poderiam atenuar a destruição tecidual no ambiente periapical inflamado; a TIIA pela sua capacidade de inibir a inflamação^{18,37} e a osteoclastogênese, bem como estimular a osteoblastogênese^{18,38}, e a T06 pela atividade anti-inflamatória e capacidade de inibição ectostérica de CatK^{16,19,39}. No entanto, essa atenuação não foi observada nos grupos que receberam a TIIA ou a T06.

Poderia ser questionado se o resultado obtido seria devido à dose utilizada das tanshinonas. O tratamento com as tanshinonas, na dose de 40mg/Kg/dia por via oral, foi iniciado no mesmo dia da indução da lesão periapical e mantido pelo período

experimental de 10 dias. Estudos realizados com a TIIA têm utilizado, em camundongos, doses variando de 10mg/kg a 90mg/kg/dia de peso por via oral^{32,40}. O tratamento com a TIIA nas dosagens de 20 mg/kg ou 30 mg/kg, durante quatro semanas, exerceu efeito benéfico no reparo de fratura do fêmur de camundongos, pois melhorou o volume da área do calo e a densidade mineral óssea em comparação com o grupo que não recebeu o tratamento³². Em relação à T06, foi verificado que a sua administração na dose de 40 mg/kg/dia por via oral, durante três meses em camundongos osteoporóticos, induziu aumento significativo da densidade mineral óssea trabecular femoral, melhorou os parâmetros ósseos estruturais, além de aumentar o número de osteoblastos e marcadores de formação óssea. Além disso, ela não teve efeito estrogênico no útero, nem mostrou toxicidade hepática ou renal¹⁹. Diante disso, foi escolhida para nosso estudo a dose de 40mg/kg/dia com a finalidade de se obter uma concentração padronizada e, conseqüentemente, poder realizar a comparação dos efeitos das TIIA e T06.

Pesquisadores têm estudado o efeito protetivo de medicações para controle de doenças ósseas líticas sobre o desenvolvimento da lesão periapical. O Odanacatib, um inibidor não ectostérico de CatK, desenvolvido para tratamento da osteoporose pós-menopausa, suprimiu a destruição óssea na periodontite apical induzida em camundongos; os animais tratados com o referido medicamento tiveram lesões periapicais menores do que aqueles não tratados nos períodos de 7, 21 e 42 dias¹⁰. Os bisfosfonatos, empregados para o tratamento de osteoporose por prevenirem a osteoclastogênese, também exerceram efeito protetivo na perda óssea periapical em dentes de ratos nos períodos de 7 e 30 dias de indução da periodontite apical^{12,13}.

Embora os estudos com Odanacatib e bisfosfonato mostraram efeitos positivos na perda óssea periapical em lesões de 7 dias^{10,12}, períodos maiores de uso das tanshinonas poderiam mostrar resultados mais favoráveis em relação à modulação da perda óssea periapical. Ainda, o uso das tanshinonas poderia ser feito não somente durante o desenvolvimento da lesão, mas também profilaticamente, antes da sua indução, como em estudo que empregou o ômega 3 por 15 dias antes da indução da lesão e 30 depois⁴¹. Por outro lado, análises que estão sendo por nós realizadas, em relação à inflamação e quantificação de osteoclastos, e à expressão de genes relacionados à inflamação e à osteoclastogênese, poderão elucidar o efeito das tanshinonas no desenvolvimento de lesão periapical.

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

3.6 REFERÊNCIAS

1. Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2021;54 (5):712-35.
2. Qian K, Xu H, Dai T, Shi K. Effects of Tanshinone IIA on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2015;388(11):1201-9.
3. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.
4. Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol*. 2014;59(9):944-53.
5. Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(3):173-80.
6. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1):19-26.
7. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. 1989;245(4920):855-7.
8. Gao B, Chen W, Hao L, Zhu G, Feng S, Ci H, et al. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. *J Dent Res*. 2013;92(2):180-6.
9. Silva LABD, Lopes ZMS, Sá RC, Novaes Júnior AB, Romualdo PC, Lucisano MP, et al. Comparison of apical periodontitis repair in endodontic treatment with calcium hydroxide-dressing and aPDT. *Braz Oral Res*. 2019;33:e092.
10. 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.
11. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. cathepsin k inhibitor regulates inflammation and bone destruction in experimentally induced rat periapical lesions. *J Endod*. 2015;41(9):1474-9.
12. Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, et al. Diminished progression of periapical lesions with zoledronic acid in ovariectomized rats. *J Endod*. 2015;41(12):2002-7.

13. Silva RAB, Sousa-Pereira AP, Lucisano MP, Romualdo PC, Paula-Silva FWG, Consolaro A, et al. Alendronate inhibits osteocyte apoptosis and inflammation via IL-6, inhibiting bone resorption in periapical lesions of ovariectomized rats. *Int Endod J*. 2020;53(1):84-96.
14. Mullard A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(10):669.
15. Chien HI, Chen LW, Liu WC, Lin CT, Ho YY, Tsai WH, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Ann Plast Surg*. 2021;86(2S Suppl 1):S78-S83.
16. Zhou ZY, Zhao WR, Zhang J, Chen XL, Tang JY. Sodium tanshinone IIA sulfonate: a review of pharmacological activity and pharmacokinetics. *Biomed Pharmacother*. 2019;118:109362.
17. Wang L, Ma R, Liu C, Liu H, Zhu R, Guo S, et al. *Salvia miltiorrhiza*: a potential red light to the development of cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2017;23(7):1077-97.
18. Ekeuku SO, Pang KL, Chin KY. The skeletal effects of tanshinones: a review. *molecules*. 2021;26(8):2319.
19. Panwar P, Xue L, S  e 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.
20. Cheng J, Chen T, Li P, Wen J, Pang N, Zhang L, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing nuclear factor-  B signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(1):26-31.
21. Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, tween-20, tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;50(4):521-6.
22. Favoretto SM, Seabra DI, Olivato MCM. Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. In: Universidade Federal de São Paulo – Unifesp: guia ilustrado. [livro na internet]. São Paulo: CEUA/UNIFESP; [2019]. [Acesso 2020 ago 08]. Disponível em: https://www.unifesp.br/reitoria/ceua/images/C/Guia_eutan%C3%A1sia_vers%C3%A3o_final_042019.pdf.
23. Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2017;50(4):352-66.

24. Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. determinants of periodontal/periapical lesion stability and progression. *J Dent Res.* 2021;100(1):29-36.
25. Von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod.* 2003;29(4):252-6.
26. Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging.* 2004;3(1):55-62.
27. Balto K, Müller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *J Dent Res.* 2000;79(1):35-40.
28. Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods.* 2010;50(1):2-13.
29. Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, et al. Ovariectomy exacerbates apical periodontitis in rats with an increase in expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Endod.* 2018;44(5):780-85.
30. Paula-Silva FWG, Arnez MFM, Petean IBF, Almeida-Junior LA, da Silva RAB, da Silva LAB, et al. Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2020;112:104670.
31. Sun Z, Wang L, Peng B. Kinetics of glycogen synthase kinase (GSK)3 β and phosphorylated GSK3 β (Ser 9) expression in experimentally induced periapical lesions. *Int Endod J.* 2014;47(12):1107-16.
32. Wang YQ, Zhang J, Zhu LX, Yu JJ, Liu MW, Zhu ST, et al. Positive correlation between activated cypa/cd147 signaling and mmp-9 expression in mice inflammatory periapical lesion. *Biomed Res Int.* 2019;2019:8528719.
33. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod.* 2010;36(2):244-50.
34. Aranha AM, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone AP, et al. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endod.* 2013;39(1):83-7.
35. Francisconi CF, Vieira AE, Azevedo MCS, Tabanez AP, Fonseca AC, Trombone APF, et al. RANKL triggers treg-mediated immunoregulation in inflammatory osteolysis. *J Dent Res.* 2018;97(8):917-27.

36. Gan G, Lu B, Zhang R, Luo Y, Chen S, Lei H, et al. Chronic apical periodontitis exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice and leads to changes in the diversity of gut microbiota. *Int Endod J*. 2022;55(2):152-63.
37. Li J, He C, Tong W, Zou Y, Li D, Zhang C, et al. Tanshinone IIA blocks dexamethasone-induced apoptosis in osteoblasts through inhibiting Nox4-derived ROS production. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13695-706.
38. 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.
39. Panwar P, Law S, Jamroz A, Azizi P, Zhang D, Ciufolini M, et al. Tanshinones that selectively block the collagenase activity of cathepsin K provide a novel class of ectosteric antiresorptive agents for bone. *Br J Pharmacol*. 2018;175(6):902-23.
40. Tang FT, Cao Y, Wang TQ, Wang LJ, Guo J, Zhou XS, et al. Tanshinone IIA attenuates atherosclerosis in ApoE(-/-) mice through down-regulation of scavenger receptor expression. *Eur J Pharmacol*. 2011;650(1):275-84.
41. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Pipa CB, Cardoso CBM, Andrada AC, et al. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting bone generation in rat apical periodontitis. *J Endod*. 2017;43(6):970-6.

4 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

13. Gao B, Chen W, Hao L, Zhu G, Feng S, Ci H, et al. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. *J Dent Res*. 2013;92(2):180-6.
14. Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*. 2000;291(2):223-34.
15. Ma J, Chen W, Zhang L, Tucker B, Zhu G, Sasaki H, et al. RNA interference-mediated silencing of Atp6i prevents both periapical bone erosion and inflammation in the mouse model of endodontic disease. *Infect Immun*. 2013;81(4):1021-30.
16. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J*. 2011;44(7):583-609.
17. Silva LABD, Lopes ZMS, Sá RC, Novaes Júnior AB, Romualdo PC, Lucisano MP, et al. Comparison of apical periodontitis repair in endodontic treatment with calcium hydroxide-dressing and aPDT. *Braz Oral Res*. 2019;33:e092.
18. Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, et al. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun*. 2015;83(4):1235-45.
19. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *J Endod*. 2015;41(9):1474-9.
20. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczak W, et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol*. 2001;48(1):1-20.
21. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D343-50.
22. Hölzen L, Parigiani MA, Reinheckel T. Tumor cell- and microenvironment-specific roles of cysteine cathepsins in mouse models of human cancers. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2020;1868(7):140423.
23. Dickinson DP. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(3):238-75.
24. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta*. 2004;342(1-2):41-69.
25. Kramer L, Turk D, Turk B. The future of cysteine cathepsins in disease management. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(10):873-98.

26. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. *Cells*. 2019;8(3):264.
27. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des*. 2007;13(4):387-403.
28. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldini S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res*. 2011;90(4):506-11.
29. Hao L, Chen J, Zhu Z, Reddy MS, Mountz JD, Chen W, et al. Odanacatib, a cathepsin k-specific inhibitor, inhibits inflammation and bone loss caused by periodontal diseases. *J Periodontol*. 2015;86(8):972-83.
30. Wang L, Zhang R, Xiong H, Peng B. The involvement of platelet-derived growth factor-A in the course of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2011;44(1):65-71.
31. Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem*. 2013;394(9):1163-79.
32. Patlaka C, Mai HA, Lång P, Andersson G. The growth factor-like adipokine tartrate-resistant acid phosphatase 5a interacts with the rod G3 domain of adipocyte-produced nidogen-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(3):446-52.
33. Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol*. 1996;74(6):759-75.
34. Duong le T, Leung AT, Langdahl B. Cathepsin k inhibition: a new mechanism for the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2016;98(4):381-97.
35. Liu H, Wang G, Gu W, Mu Y. Cathepsin k: the association between cathepsin k expression and sphenoid sinus invasion of pituitary adenomas. *Med Hypotheses*. 2016;97:88-9.
36. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin k inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocr Rev*. 2017;38(4):325-50.
37. Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, et al. Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem*. 1994;269(2):1106-9.
38. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13453-8.
39. Watanabe R, Okazaki R. Reducing bone resorption by cathepsin K inhibitor and treatment of osteoporosis. *Clin Calcium*. 2014;24(1):59-67.

40. Lu J, Wang M, Wang Z, Fu Z, Lu A, Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin k inhibitors on bone resorption. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2018;33(1):890-904.
41. Hao L, Zhu G, Lu Y, Wang M, Jules J, Zhou X, et al. Deficiency of cathepsin k prevents inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis and periodontitis and reveals its shared osteoimmune role. *FEBS Lett*. 2015;589(12):1331-9.
42. Yu NY, Fathi A, Murphy CM, Mikulec K, Peacock L, Cantrill LC, et al. Local co-delivery of rhBMP-2 and cathepsin k inhibitor L006235 in poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(1):136-44.
43. Yamashita DS, Dodds RA. Cathepsin k and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr Pharm Des*. 2000;6(1):1-24.
44. Pennypacker BL, Chen CM, Zheng H, Shih MS, Belfast M, Samadfam R, et al. Inhibition of cathepsin k increases modeling-based bone formation, and improves cortical dimension and strength in adult ovariectomized monkeys. *J Bone Miner Res*. 2014;29(8):1847-58.
45. Panwar P, Xue L, Søre K, Srivastava K, Law S, Delaisse JM, et al. An Ectosteric Inhibitor of cathepsin k inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 2017;32(12):2415-30.
46. Mullard A. Merck & Co. drops osteoporosis drug odanacatib. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(10):669.
47. Medivir - MIV-711 osteoarthritis trial [homepage na internet]. Suécia: comuna da Huddinge; c2016 [acesso em: 2020 nov 18]. Disponível em: <https://news.cision.com/medivir/r/miv-711-osteoarthritis-trial--successful-third-independent-review-of-safety-data-and-trial-continues,c2144680>
48. Careta MF, Romiti R. Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *An Bras Dermatol*. 2015;90(1):62-73.
49. Tan AY, Zimetbaum P. Atrial fibrillation and atrial fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(6):625-9.
50. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the framingham study. *Stroke*. 1991;22(8):983-8.
51. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(8):746-56.
52. Panwar P, Søre K, Guido RV, Bueno RV, Delaisse JM, Brömme D. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. *Br J Pharmacol*. 2016;173(2):396-410.

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

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

APÊNDICE A – Metodologia detalhada

Preparo das tanshinonas

A TIIA (Sigma Aldrich, 51704; St. Louis, MO, USA) foi preparada na concentração 5 mg/mL, utilizando polissorbato 20, também denominado Tween 20, (15 % volume/volume) (v/v)²¹, etanol (2 % v/v) e água destilada. A mistura foi homogeneizada em agitador vórtex a 2800 Rpm (Kasvi, K45-2820, Ouro Fino, PR, Brasil) e mantida em banho ultrassônico por 10 minutos. A T06 (Sigma Aldrich, 2517) foi preparada a 5 mg/mL com água destilada aquecida a 40 °C e homogeneizada por 3 minutos no agitador vortex. As tanshinonas foram preparadas diariamente e administradas nos animais via gavagem (200µl/animal), na dose de 40mg/Kg¹⁹, uma vez ao dia, durante 10 dias.

Animais

A estimativa do tamanho da amostra necessária para o estudo do volume da lesão periapical foi calculado usando o software G * Power 3.1 para Windows (Franz Faul, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Alemanha). O cálculo, baseado em um tamanho de efeito = 0,64, [com base no estudo de Hao et al.¹⁰ e em resultados do nosso grupo de pesquisa sobre volume de lesão periapical em dentes de camundongos], poder de teste (β) = 0,8 e α = 0,05, usando "família de teste F" (ANOVA one-way), mostrou serem necessários 8 espécimes por grupo, em cada um dos períodos experimentais. No entanto, como perdas podem ocorrer durante o procedimento, por meio da anestesia ou ato operatório (fatura ou perfuração de dente), fizemos a previsão de 10 espécimes por grupo.

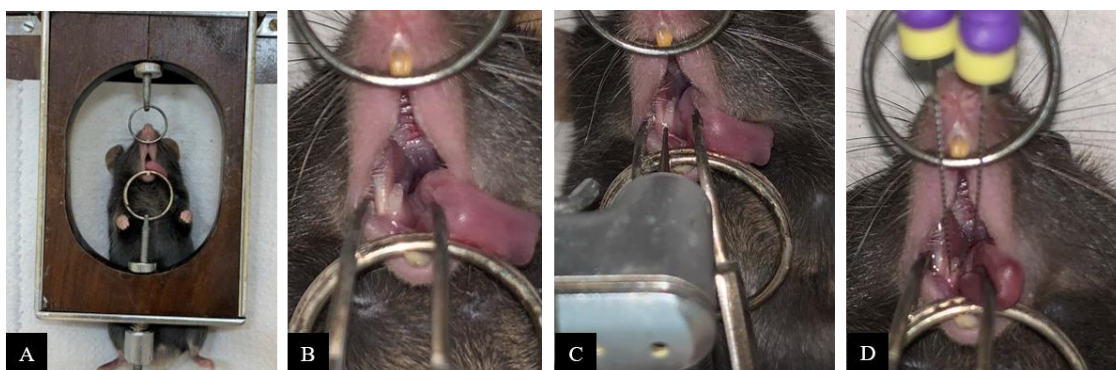
Após aprovação do projeto de pesquisa (Proc. CEUA nº 19/2020) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (ANEXO A), foram utilizados 40 camundongos *wild-type* (WT) da linhagem C57BL/6, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 23 gramas, provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA), do Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu (IBTEC). Os camundongos foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 x 20 cm (4 a 6 animais por gaiola), forradas com cama de maravalha, em temperatura (22±2°C) e

umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água.

Indução da periodontite apical e tratamento dos animais

Periodontite apical foi induzida nos primeiros molares inferiores dos lados direito e esquerdo de camundongos *wild-type* C57BL/6. Para a realização dos procedimentos operatórios os animais foram anestesiados com ketamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP), na dosagem de 1 mL/Kg de peso do animal, e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), na dosagem de 0,5 mL/Kg de peso do animal, via intraperitoneal. Em seguida, os camundongos foram devidamente posicionados em mesa cirúrgica específica para a realização de procedimentos odontológicos, permitindo sua imobilização e manutenção da boca aberta, para acesso aos primeiros molares inferiores. A abertura coronária dos primeiros molares inferiores foi realizada pela face oclusal, com broca esférica de aço inoxidável (n° 1/4 - KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP), montada em motor elétrico (Endo Pro Torque 6000 RPM, 45315991; Driller, SP, Brasil). Em seguida, os canais radiculares foram localizados e explorados com uma lima do tipo Kerr 10 (Maillefer Dentsply Sirona, York, Pensilvânia) para remoção ou desorganização da polpa radicular⁴ (Figura 2).

Figura A1 – Indução da periodontite apical no primeiro molar inferior de camundongos *wild-type* da linhagem C57BL/6.



(A) Posicionamento do camundongo na mesa cirúrgica específica para procedimentos odontológicos. (B) Visualização dos molares inferiores do lado direito, o que é possível pelo afastamento da língua e bochecha com uma pinça clínica. (C) Posicionamento do motor e da fresa esférica junto ao primeiro molar inferior. (D) Localização dos canais mesial e distal com o auxílio de limas tipo K #10.

Fonte: Elaboração própria.

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=10/grupo) de acordo com a tabela 1: Grupo sem indução da PA e sem intervenção terapêutica; Grupo com indução de PA e tratamento com TIIA (40 mg/Kg/dia); Grupo com indução de PA e tratamento com T06 (40 mg/Kg/dia); e Grupo com indução de PA e tratamento com veículo (água destilada). O tratamento com as tanshinonas e veículo foi iniciado no mesmo dia da abertura coronária e foi mantido por 10 dias, sendo a administração realizada por gavagem, uma vez ao dia, durante os 10 dias de duração do experimento. A via de administração e dosagem das tanshinonas foi baseada em estudo anterior¹⁹.

Tabela A1 - Descrição da distribuição de grupos, tratamento e número de animais

Grupos	Especificação de cada grupo	Quantidade de Animais
Grupo Controle	Sem indução de periodontite apical (PA) e sem tratamento	10
Grupo PA + TIIA	Com indução de PA e tratamento com tanshinona IIA	10
Grupo PA + T06	Com indução de PA e tratamento com tanshinona 06	10
Grupo PA + água	Com indução de PA e tratamento com veículo (água)	10

Fonte: Elaboração própria

Após o período de 10 dias de indução da periodontite apical, os animais foram submetidos à eutanásia com sobre dose anestésica com Quetamina (180mg/kg) e Xilazina (30mg/kg) por via intraperitoneal, de acordo pelo Guia de Eutanásia para animais de ensino e pesquisa emitido pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP²², sendo que os métodos de confirmação da morte do animal seguiram o guia brasileiro de boas práticas para eutanásia com animais que consistem na: ausência de movimentos torácicos e sinais de respiração. Após a eutanásia, as mandíbulas foram removidas com tesoura cirúrgica, dissecadas com auxílio de alicate e separadas em hemi-mandíbulas direita e esquerda. Uma hemi-mandíbula foi fixada por imersão em formaldeído 4% tamponado por 48 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, os espécimes foram lavados e colocados em solução de álcool 70 % para a realização do escaneamento em microtomógrafo.

Microtomografia computadorizada (micro-CT)

As hemi-mandíbulas foram escaneadas em microtomógrafo SkyScan (Skyscan 1176 in vivo, Kontich, Bélgica). Para a seleção dos parâmetros de aquisição foi tomado como base estudo do nosso grupo de pesquisa²³ e o manual do microtomógrafo que indica o uso de filtro de alumínio de 0,5mm e voxel de 18µm para tecidos ósseos de camundongos. Por consequência a kilovoltagem (kV), a amperagem e o tempo de exposição foram 50kV, 500µA e 300ms respectivamente (padronização do aparelho). Foram usados rotação de 180°, frame de 3 e passos de rotação de 0,5°. Em seguida, as imagens foram transportadas para o programa NRecon v.1.6.6.0 (Skyscan) e reconstruídas usando parâmetros de *smoothing* (0%), *beam-hardening correction* (2%), *ring artifact reduction* (2%) e *gray dataset* (0.010 – 0.113). Esses valores foram definidos utilizando a ferramenta "*fine turning*" que permite avaliar cada valor dos parâmetros de reconstrução possibilitando a seleção da imagem com menor quantidade de ruídos/ artefatos. No programa Dataviewer (Skyscan), as imagens foram orientadas nos planos coronal, axial e sagital. Estas orientações foram realizadas seguindo os eixos X (linha azul), Y (linha verde) e Z (linha vermelha). Para obter a orientação padrão no plano sagital, a abertura cervical do canal distal do primeiro molar inferior e forame apical foram alinhados com o eixo X, enquanto no plano coronal, o longo eixo da raiz distal foi alinhado paralelamente ao eixo Z. No plano axial, os canais radiculares mesial e distal do primeiro molar foram alinhados com o eixo Z, mantendo os dois canais paralelos a ele. O eixo Y não foi usado para orientação. Independentemente da orientação, os planos coronal, sagital e axial foram mantidos perpendiculares um ao outro²³. Depois de orientadas, as imagens do plano sagital foram salvas e transportadas para o programa CTAn (Skyscan) para análise do espaço periapical na raiz distal do primeiro molar inferior. Foram selecionados os cortes microtomográficos da extensão de toda a lesão periapical envolvendo a raiz (média de número de cortes por espécime = 25). Não foram utilizados cortes que não mostraram estrutura radicular, pois a área radiolúcida sem a presença da raiz como referencial poderia ser confundida com ligamento periodontal. No programa CTAn (Skyscan) foi utilizada a ferramenta "COLOR" para facilitar a visualização e delimitação da margem da lesão periapical/espço periapical por meio do ROI (região de interesse) personalizado. Foram utilizados os valores de *threshold* de 0 e 45 pois foi utilizado o ROI personalizado. O valor do volume do espaço periapical em mm³ foi

anotado²³. Todas as medidas foram realizadas por um examinador experiente que não possuía informações prévias de identificação dos grupos avaliados.

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA.), com nível de significância de 5%. Como apresentaram distribuição normal, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e homogeneidade das variâncias, constatada pelo teste de Bartlett, os dados foram comparados empregando análise de variância (ANOVA) de uma via e pós-teste de Tukey.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 19/2020

Araraquara, 26 de março de 2021.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado **"TANSHINONAS: INIBIDORES DE CATEPSINA K COMO POTENCIAIS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL E PERIODONTITE APICAL"** (Proc. CEUA nº 19/2020), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração na metodologia.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **MAIO/2022**.

Atenciosamente.


Profa. Dra. **CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**
Coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 25 de março de 2022.

Sâmmea Martins Vieira