

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NATÁLIA DE QUEIROZ MELO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA TANSHINONA PARA INIBIR A
PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR INFLAMAÇÃO: ANÁLISE
MICROTOMOGRÁFICA EM MODELO MURINO DE CALVÁRIA**

Goiânia

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Natália de Queiroz Melo

3. Título do trabalho

Avaliação do potencial da tanshinona para inibir a perda óssea induzida por inflamação: análise microtomográfica em modelo murino de calvária

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Gileade Pereira Freitas, Professor do Magistério Superior**, em 08/06/2026, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Natália De Queiroz Melo, Usuário Externo**, em 08/06/2026, às 20:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6242290** e o código CRC **ADE2F936**.

NATÁLIA DE QUEIROZ MELO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA TANSHINONA PARA INIBIR A
PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR INFLAMAÇÃO: ANÁLISE
MICROTOMOGRÁFICA EM MODELO MURINO DE CALVÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Linha de Pesquisa: Alterações do Sistema Estomatognático.

Orientador: Prof. Dr. Gileade Pereira Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

GOIÂNIA

2026

Melo, Natália de Queiroz
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA TANSHINONA PARA INIBIR A PERDA
ÓSSEA INDUZIDA POR INFLAMAÇÃO [Manuscrito]: ANÁLISE
MICROTOMOGRÁFICA EM MODELO MURINO DE CALVÁRIA / Natália de Queiroz
Melo. - 2026.
LII, 52 f.: 2026

Orientador: Prof. Dr. Gileade Pereira Freitas; co-orientador: Dr. Pedro Paulo
Chaves de Souza

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de
Odontologia (FO), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Goiânia, 2026.

Bibliografia.

Inclui: siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Reabsorção Óssea. 2. Agentes de Conservação da Densidade Óssea.
3. Lipoproteína.. 4. Densidade Óssea.

I. Freitas, Gileade Pereira, orient. II. Souza, Pedro Paulo Chaves de , co-orient. III.
Título.

CDU 616.314



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **18/2026** da sessão de Defesa de Dissertação de **Natália de Queiroz Melo**, que confere o título de Mestra em **Odontologia**, na área de concentração em **Clínica Odontológica**.

Aos **vinte e cinco dias do mês de maio de dois mil e vinte e seis**, a partir das **catorze horas**, na Sala de aula 3, da Faculdade de Odontologia da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Avaliação do potencial da tanshinona para inibir a perda óssea induzida por inflamação: análise microtomográfica em modelo murino de calvária**". Os trabalhos foram instalados pelo orientador, **Professor Doutor Gileade Pereira Freitas (PPGO/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professor Doutor Virgílio Moreira Roriz (PPGO/UFG)**, membro titular interno; **Professor Doutor Hidecazio de Oliveira Sousa (PRAE/UFG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Gileade Pereira Freitas**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e cinco dias do mês de maio de dois mil e vinte e seis**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve



Documento assinado eletronicamente por **Gileade Pereira Freitas, Professor do Magistério Superior**, em 25/05/2026, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgílio Moreira Roriz, Professor do Magistério Superior**, em 25/05/2026, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hidecazio De Oliveira Sousa, Técnico**, em 25/05/2026, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6212796** e o código CRC **ECC5C8D2**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para a minha trajetória de vida e, sobretudo, acadêmica: aos que estenderam a mão com paciência para ensinar; aos que enxergaram em mim habilidades que eu ainda não reconhecia; aos que plantaram a semente do desejo pela docência; aos que foram sopro de esperança quando ela parecia inexistente; e àqueles que, de alguma forma, ajudaram a lapidar a minha história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que foi e continua sendo o principal autor da minha trajetória, guiando meus passos e me concedendo força, sabedoria e perseverança ao longo de toda a minha caminhada.

À minha família, por ser minha base e sustentação em todos os momentos, pelo amor, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim, mesmo diante das dificuldades.

Aos meus amigos, pelo incentivo constante, compreensão e por tornarem essa jornada mais leve.

Ao meu orientador, pela dedicação, paciência e pelos valiosos ensinamentos ao longo deste percurso, fundamentais para a minha formação acadêmica e profissional.

Ao coorientador, pela confiança ao me conceder a oportunidade de desenvolver este projeto e pelo suporte durante sua execução.

À equipe de pesquisa, pela colaboração, troca de conhecimentos e apoio durante todas as etapas deste trabalho. Agradecimento especial a Giovanna Acioli, Joyce Carrijo e Amanda Barreira, cuja presença e auxílio diário durante a etapa experimental foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. A dedicação e o apoio constantes de vocês tiveram papel fundamental na execução desta pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (FOA - UNESP), especialmente ao Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon e à sua equipe, pelo suporte e contribuição na realização da etapa da microtomografia computadorizada (micro-CT). Em especial, à Yasmin Milhomens, doutoranda da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), pela disponibilidade, auxílio e valiosa colaboração nas análises microtomográficas deste estudo.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), pelo fornecimento dos animais utilizados neste estudo.

Ao Instituto de Ciências Biológicas II (ICB II) e à equipe envolvida, pelo suporte no manejo, armazenamento, treinamento dos animais e auxílio na execução da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Goiás (PPGO/UFG), pela formação acadêmica proporcionada, suporte institucional e pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido a este projeto (Processo nº 405935/2023-4, Chamada nº 10/2023), fundamental para a aquisição dos insumos e materiais utilizados na realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela concessão da bolsa de mestrado, que possibilitou minha dedicação integral ao curso e o desenvolvimento desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo apoio financeiro por meio da Chamada Pública nº 21/2024 (Processo Administrativo nº AUX2024361000140), que contribuiu para o transporte necessário à execução deste estudo.

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”

Aristóteles

RESUMO

Introdução. As doenças caracterizadas por destruição e perda óssea, especialmente aquelas associadas a processos inflamatórios, comprometem significativamente a qualidade de vida dos indivíduos, justificando a busca por agentes terapêuticos capazes de modular a reabsorção óssea. Nesse contexto, a tanshinona destaca-se como um composto bioativo natural com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e moduladoras do metabolismo ósseo, apresentando potencial atuação na regulação da atividade osteogênica. Adicionalmente, a utilização de moléculas derivadas de componentes bacterianos tem possibilitado melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro e nos processos de reabsorção óssea. Dentre essas moléculas, o Pam2CSK4, um lipopeptídeo sintético, destaca-se como potente indutor de resposta inflamatória e reabsorção óssea. **Objetivo.** Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do Pam2CSK4 na indução de reabsorção óssea e o efeito da tanshinona IIA (TII-A) na redução da reabsorção óssea, em modelo experimental de calvária de camundongos. **Metodologia.** Realizou-se um estudo experimental, laboratorial in vivo, com delineamento cego. Foram utilizados camundongos machos, distribuídos em três grupos (n=6): grupo controle (CONTROLE), que recebeu solução salina; grupo submetido à indução inflamatória (Pam2CSK4); e grupo tratado com TII-A associada à indução inflamatória (TII-A). Através de análise microtomográfica, foram avaliados parâmetros relacionados à microarquitetura óssea, como, volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th) e separação trabecular (Tb.Sp). **Resultados.** Observou-se redução significativa em parte dos parâmetros avaliados. Os grupos Pam2CSK4 e TII-A apresentaram redução significativa do volume ósseo (BV) ($p = 0,025$ e $p = 0,012$, respectivamente) e da porcentagem de volume ósseo (BV/TV) ($p = 0,025$ e $p = 0,012$, respectivamente) em comparação ao grupo controle, sem diferenças significativas entre os grupos Pam2CSK4 e TII-A ($p = 0,897$). A espessura trabecular (Tb.Th) também apresentou diferenças significativas em comparação ao grupo controle, tanto no grupo Pam2CSK4 ($p < 0,001$) quanto no grupo TII-A ($p = 0,012$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Pam2CSK4 e TII-A ($p = 0,054$). Em contrapartida, o número de trabéculas (Tb.N) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p = 0,059$). De maneira semelhante, o parâmetro de separação trabecular (Tb.Sp) também não demonstrou diferenças significativas na comparação entre os grupos controle, Pam2CSK4 e TII-A ($p = 0,256$). **Conclusão.** O modelo experimental

induzido por Pam2CSK4 foi eficaz em promover alterações relacionadas à reabsorção óssea nas calvárias dos animais avaliados. Contudo, a TII-A não demonstrou efeito antirreabsortivo significativo nas condições estabelecidas neste estudo. Os achados identificados na análise microtomográfica com relação as alterações na microarquitetura óssea no estudo, ressaltam a complexidade da modulação farmacológica da perda óssea inflamatória e reforçam a necessidade de futuras investigações para melhor elucidação do potencial terapêutico da substância estudada.

Palavras-chave: Reabsorção óssea; Agentes de conservação da densidade óssea; Lipoproteína; Densidade óssea.

ABSTRACT

Introduction. Diseases characterized by bone destruction and loss, especially those associated with inflammatory processes, significantly compromise the quality of life of individuals, justifying the search for therapeutic agents capable of modulating bone resorption. In this context, tanshinone stands out as a natural bioactive compound with anti-inflammatory, antioxidant, and bone metabolism-modulating properties, showing potential action in regulating osteogenic activity. Additionally, the use of molecules derived from bacterial components has enabled a better understanding of the mechanisms involved in the host immune response and bone resorption processes. Among these molecules, Pam2CSK4, a synthetic lipopeptide, stands out as a potent inducer of inflammatory response and bone resorption. **Objective.** This study aimed to evaluate the effect of Pam2CSK4 on the induction of bone resorption and the effect of tanshinone IIA (TII-A) on the reduction of bone resorption in an experimental mouse calvaria model. **Methodology.** An experimental, in vivo laboratory study with a blinded design was conducted. Male mice were used, distributed into three groups (n=6): a control group (CONTROL), which received saline solution; a group subjected to inflammatory induction (Pam2CSK4); and a group treated with TII-A associated with inflammatory induction (TII-A). Through microtomographic analysis, parameters related to trabecular bone microarchitecture were evaluated, such as bone volume (BV), percentage of bone volume (BV/TV), number of trabeculae (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), and trabecular separation (Tb.Sp). **Results.** A significant reduction was observed in some of the evaluated parameters. The Pam2CSK4 and TII-A groups showed a significant reduction in bone volume (BV) ($p = 0.025$ and $p = 0.012$, respectively) and percentage of bone volume (BV/TV) ($p = 0.025$ and $p = 0.012$, respectively) compared to the control group, with no significant differences between the Pam2CSK4 and TII-A groups ($p = 0.897$). Trabecular thickness (Tb.Th) also showed significant differences compared to the control group, both in the Pam2CSK4 group ($p < 0.001$) and in the TII-A group ($p = 0.012$). However, no statistically significant differences were observed between the Pam2CSK4 and TII-A groups ($p = 0.054$). Conversely, the number of trabeculae (Tb.N) did not show a statistically significant difference between the groups evaluated ($p = 0.059$). Similarly, the trabecular separation parameter (Tb.Sp) also did not show significant differences when comparing the control, Pam2CSK4, and TII-A groups ($p = 0.256$). **Conclusion.** The experimental model induced by Pam2CSK4 was effective in promoting changes related to bone resorption in the calvaria of the animals evaluated. However, TII-A did not demonstrate a significant anti-resorptive effect under the conditions established in this study. The findings

identified in the microtomographic analysis regarding changes in bone microarchitecture in the study highlight the complexity of the pharmacological modulation of inflammatory bone loss and reinforce the need for future investigations to better elucidate the therapeutic potential of the substance studied.

Keywords: Bone resorption; Agents for preserving bone density; Lipoprotein; Bone density.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo das etapas de experimentação.....	27
Figura 2. Representação em fluxograma das etapas da experimentação.....	28
Figura 3. A. Painel de controle do vaporizador de isoflurano demonstrando fluxo de ar de 2,2 L/min e concentração ajustada para 8% durante a fase de indução anestésica. B. Anestesia inalatória com isoflurano sendo realizado em camundongo.....	30
Figura 4. Injeção da substância Pam2CKs4 ou soro fisiológico no camundongo.....	31
Figura 5. Administração do dipirona via intraperitoneal em camundongo.....	32
Figura 6. Aplicação da TII-A via gavagem no camundongo.....	33
Figura 7. Imagens reconstruídas por microtomografia computadorizada (microCT) da estrutura óssea do crânio do camundongo em diferentes planos (corte transversal axial evidenciando a arquitetura óssea interna. Painel inferior esquerdo: corte coronal mostrando a espessura e continuidade do osso craniano. Painel inferior direito: corte sagital detalhando a morfologia óssea ao longo do eixo anteroposterior. As linhas coloridas indicam os planos de corte cruzados para referência espacial.....	35
Figura 8. Vista superior da calota craniana evidenciando integridade da superfície óssea, sem presença de áreas de reabsorção óssea. A figura apresenta duas amostras do mesmo grupo experimental.....	37
Figura 9. Vista superior da calota craniana evidenciando múltiplas áreas de reabsorção óssea distribuídas difusamente. A figura apresenta duas amostras do mesmo grupo experimental (PAM2CSK4), ambas exibindo padrão morfológico semelhante de reabsorção óssea.....	37
Figura 10. Vista superior da calota craniana evidenciando múltiplas áreas de reabsorção óssea distribuídas difusamente. A figura apresenta duas amostras do grupo experimental tratado com TIIA.....	38

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1.** Cálculo da diluição da TII-A, considerando a concentração inicial da substância e o volume final desejado, para obtenção da concentração experimental estabelecida no protocolo.....23
- Quadro 2.** Cálculo da diluição do Pam2CSK4, considerando a concentração inicial da substância e o volume final desejado, para obtenção da concentração experimental estabelecida no protocolo.....24
- Tabela 1.** Comparação dos parâmetros de microarquitetura óssea obtidos por micro-CT entre os grupos Controle, PAM2CSK4 e TIIA (n=6)34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMSCs – Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

C2C12 – Mouse Myoblast Cell Line C2C12

Col-I – Collagen Type I

Ctsk – Catepsina K

hMSCs – Human Mesenchymal Stem Cells

hPDLSCs – Human Periodontal Ligament Stem Cells

IGF-I – Insulin-like Growth Factor 1

IL-6 – Interleucina 6

LPS – Lipopolissacarídeo

MC3T3-E1 – Mouse Calvaria-Derived Preosteoblast Cell Line MC3T3-E1

MG63 – Human Osteosarcoma Cell Line MG63

MyD88 – Myeloid Differentiation Primary Response 88

OCN – Osteocalcina / Osteocalcin

OPN – Osteopontina / Osteopontin

Osx – Osterix

PAMP – Pathogen-Associated Molecular Pattern

RANK – Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B

RANKL – Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand

ROI – Region of Interest

Runx2 – Runt-related Transcription Factor 2

SPARC – Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine

TII-A – Tanshinona IIA

TLR2 – Toll-like Receptor 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFG – Universidade Federal de Goiás

VOI – Volume of Interest

LISTA DE SÍMBOLOS

α – Nível de significância estatística

% – Porcentagem

BV – Volume ósseo (mm³)

BV/TV – Porcentagem de volume ósseo pelo volume total (%)

BS – Superfície óssea (mm²)

kV – Quilovolt

kg – Quilograma

L/min – Litros por minuto

mg – Miligrama

mm – Milímetro

mL – Mililitro

μA – Microampère

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

n – Número de amostras por grupo

p – Valor de probabilidade

Tb.N – Número trabecular (1/mm)

Tb.Sp – Separação trabecular (mm)

Tb.Th – Espessura trabecular (mm)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 MECANISMOS BIOQUÍMICOS NO PROCESSO DE FORMAÇÃO E REABSORÇÃO ÓSSEA.....	15
2.2 O PAPEL DAS LIPOPROTEÍNAS NA INDUÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOCLASTOS E O MECANISMO DO PAM2CSK4	16
2.3 APLICABILIDADE DA TANSHINONA NA REABSORÇÃO ÓSSEA E O SEU MECANISMO DE AÇÃO	19
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 LOCAL DO ESTUDO E VIABILIDADE	23
4.2 MANEJO DOS ANIMAIS E TAMANHO DA AMOSTRA.....	23
4.3 EXPERIMENTAÇÃO	24
4.3.1 Procedimento Operacional Padrão da diluição das substâncias e da experimentação	24
4.3.2 Execução do 1º dia de experimentação	29
4.3.3. Realização do 2, 3, 4º dia de experimentação	33
4.3.4 Procedimentos experimentais no 5º e 7º dia	34
4.4 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA.....	34
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A estrutura óssea consiste em um componente complexo, heterogêneo e estruturado, composto por hidroxapatita. A fase orgânica compõe-se por colágeno tipo I, além de proteínas, lipídios e água. Na composição celular do osso apresentam-se células precursoras ao tratar-se da modulação e densidade óssea, como, os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e também as de revestimento (Pereira *et al*, 2020).

O tecido ósseo possui propriedade regenerativa, que através de uma cascata molecular procede-se com a produção de matriz de colágeno (tipo I e II), e a formação envolve mecanismos e participação de fatores bioquímicos como moléculas sinalizadoras que atuam no processo de regeneração (Pereira *et al*, 2020). Entretanto, uma diversidade de fatores etiológicos como, traumas, infecções, ressecção de tumores, anomalias esqueléticas, defeitos congênitos, e alterações metabólicas impactam na formação óssea, tornando a reparação total dificultada, resultando na necessidade de tratamentos reparadores ou conservadores (Kronemberger *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2022; Pereira *et al*, 2020).

Com relação a doenças que afetam o metabolismo ósseo pode-se citar a osteoporose, artrite reumatoide e doença periodontal. O impacto envolve diretamente a qualidade de vida do indivíduo, sendo estudados agentes terapêuticos que vise regular a reposição óssea, como os bisfosfonatos, antireabsortivos e antireumáticos. No entanto, existem limitações que envolvem efeitos como osteonecrose e fraturas patológicas (Molon,2025; Hascoet, *et al.*,2023).

Considerando as limitações dos tratamentos já consolidados na prática clínica com limitações, estudos visando terapias adjuvantes que trate a resposta imune e o seu impacto na osteoclastogênese tem sido desenvolvido (Molon, 2025), como a investigação de inibidores seletivos de processo inflamatório (Panwar *et al*, 2017).

Dentre os inibidores de processo inflamatório está a tanshinona (TII-A), que consiste em um componente natural oriundo da erva *Salvia miltiorrhiza*, e recentes estudos demonstraram que ela apresenta capacidade de inibir seletivamente a atividade da colagenolítica da catepsina K (Ctsk), uma protease secretada pelos osteoclastos maduros, com função de mediar a reabsorção óssea. Acresce que, a Ctsk atua na degradação do colágeno tipo I que é crucial na manutenção do osso, ou seja, a sua supressão ocasionada

pela TII-A, desencadeia na redução da reabsorção óssea. (Panwar *et al*, 2017; Dai *et al*, 2020).

Ademais, em um estudo de revisão realizado sobre os efeitos esqueléticos da TII-A, foi relatado a sua atividade anti-osteoporótica com redução da osteoclastogênese e aumento da osteoblastogênese, sugerindo uma possível aplicação clínica em casos de resolução e prevenção de doenças periodontais, osteoporose e demais distúrbios sistêmicos que afetam a remodelação do osso (Ekeuku; Pang; Chin, 2021).

Modelos experimentais como ratos e camundongos apresentam características que favorecem a realização de estudos sobre processos do sistema imunológico e inflamatório, além de baixo custo e redução de possíveis riscos que ocorreriam dentro das limitações de estudos primários em seres humanos (De molon; Avila; Cirelli, 2013). A aplicação de indutores de reações inflamatórias como o lipopeptídeos sintéticos apresentam vantagens quanto a obtenção, manipulação e livre de contaminantes. Nesse sentido, foi demonstrado que o indutor de reações inflamatórias Pam2CSK4, um lipopetídeo sintético, foi eficaz na indução de reabsorção óssea, atuante no processo de diferenciação de osteoclastos através da presença e ativação de receptores de membrana tipo TLR2 (tool-like receptors) (Kim *et al*, 2013; Kassem, 2015).

Baseado no acima exposto, a pergunta de pesquisa deste estudo foi: “o TII-A é eficaz na inibição de perda óssea induzida por um processo inflamatório desencadeado por Pam2CSK4?”.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismos bioquímicos no processo de formação e reabsorção óssea

A remodelação óssea envolve um processo dinâmico com presença e atuação de células precursoras, e ao tratar-se da reabsorção óssea os osteoclastos desempenham um papel importante na degradação óssea. Os osteoclastos são células derivadas de células da linhagem de macrófagos e monócitos, secretando componentes, como a catepsina K que ocasiona na degradação da matriz óssea (Wang *et al.*, 2024). Em continuidade fatores como, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o RANKL secretados pelos osteoblastos, são citocinas envolvidas no processo de osteoclastogênese, e diferenciação dos osteoclastos (Samwald *et al.*, 2022; Udagawa *et al.*, 2021)

Diante disso, a reabsorção óssea é mediada pela sinalização do RANK-RANKL que regula a expressão da catepsina K, uma enzima que apresenta um papel crucial na degradação do colágeno tipo I, o principal componente da estrutura óssea. Dessa forma, a catepsina K é reconhecida como um fator a ser controlado em um possível tratamento de controle de reabsorção óssea. A presença de receptores de citocinas permite a continuidade da cascata de inflamação e conseqüente perda óssea. Assim, a inibição da diferenciação dos osteoclastos apresenta-se como uma estratégia promissora para o tratamento de perda óssea (Wang *et al.*, 2024).

Em continuidade as células envolvidas na estruturação da matriz óssea, os osteoblastos, derivadas de células troncos mesenquimais (MsCs) são responsáveis pela formação óssea, sintetizando proteínas que orientam a mineralização óssea. Linhagens pré-osteoblástica, como, células MC3T3 E1, células MG, células MG63, células precursoras mesenquimais pluripotentes C2C12, células-tronco do ligamento periodontal humano (hPDLSCs), células tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) e células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), representam componentes de interesse em estudos de mineralização e regeneração óssea (Veis; O'Brien, 2023; Samwald *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024).

Nesse contexto, a formação osteoblástica também pode ser avaliada por marcadores como, *Osx*, *Runx2*, *Col-I*, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I), *OCN*, osteopontina (*OPN*) e osteonectina. De modo mais preciso, a regulação seja com

ativação ou ativação de vias de sinalização, proteínas e células envolvidas no mecanismo de estruturação óssea pode ser precursor, e contribuinte na tratativa de doenças ósseas (Wang *et al.*, 2024)

2.2 O papel das lipoproteínas na indução e diferenciação de osteoclastos e o mecanismo do Pam2CSK4

Doenças caracterizadas pela destruição e perda óssea são conhecidas também como doenças osteolísticas, podendo ser de origem inflamatória, como a artrite reumatoide, osteomilite e na odontologia como uma das principais doenças periodontais mais prevalente, a periodontite (Hascoet *et al.*, 2023. Molon, 2025).

Ao tratar-se da perda óssea é reconhecido que processos inflamatórios podem desencadear no aumento da reabsorção óssea e redução da formação óssea, contribuindo diretamente para a diminuição de massa óssea (Henning *et al.*, 2024). Estudos com objetivo de avaliar a influência do processo inflamatório na densidade óssea, demonstraram áreas reduzidas de mineralização ativa em superfícies adjacentes a inflamação, sendo observado também o aumento na expressão de marcadores e células envolvidas no processo de osteoclastogênese (Andreev *et al.*, 2022; Henning *et al.*, 2024).

Células imunes e inflamatórias ao serem ativadas e exacerbadas, desencadeia em ação de citocinas pró inflamatórias, que se resulta na destruição de tecido conjuntivo mineralizado (Pavanelli *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2024). A presença de tipos celulares e suas vias associadas a inflamação óssea, indicam a possibilidade de estudos voltados para o desenvolvimento de terapias que modulem especificamente as respostas inflamatórias. E estudos recentes têm apresentado o foco sobre mediadores específicos que atuam na expressão de citocinas que exacerbam a produção de osteoclastos e consequente perda óssea, ou seja, fatores que estão diretamente relacionados a desregulação imune e sintetizadores inflamatórios (Dai *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2024).

Por conseguinte, a expressão abundante de Ctsk foi identificada como um dos responsáveis pela degradação da matriz óssea, sendo assim, presente na progressão de lesões periodontais, periapicais e demais doenças metabólicas e inflamatórias envolvendo a configuração óssea (Dai *et al.*, 2020). Outro fator presente na degradação óssea é

Sinalização do Fator Nuclear γ B (NF- γ B) que consiste em uma ponte entre a inflamação e a reabsorção óssea, impulsionando a osteoclastogênese (Trares.; Ackermann; Koch, 2022; Molon, 2025)

A utilização de moléculas derivadas de bactérias permite a avaliação de seus mecanismos e da resposta imune do hospedeiro. Modelos experimentais, como animais, permitem estudos que avaliem a respostas inflamatórias associada a interação entre o hospedeiro e os microorganismos, de maneira mais específica e controlada sobre a patogênese estudada (Molon et al, 2014; Souza *et al.*, 2020). Tendo em vista o estudo da regulação da osteoclastogênese, a utilização de bactérias e suas moléculas modificadas são um dos métodos para se avaliar mecanismos específicos, reduzindo desvantagens, tais como, variações de um lote para outro, contaminações e até mesmo dificuldades sobre a obtenção (Souza *et al.*, 2020).

Nesse contexto, quando se trata do sistema imunológico o mesmo reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs). A ativação desses receptores desencadeia vias de sinalização intracelular que promovem a regulação positiva de genes relacionados à resposta inflamatória, resultando na produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, fundamentais para a resposta antimicrobiana (Lin *et al.*, 2014; Palm *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2020).

As lipoproteínas que são expressas por bactérias gram-positivas e negativas são reconhecidas pela TLR2/TLR6 e TLR2/TLR1 e são indicados como importantes componentes no mecanismo de ação de destruição óssea causadas por infecções bacterianas, o que direciona para o entendimento de suas respectivas atuações e a sua inativação ou exacerbação (Takeuchi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2013). Em um estudo realizado para identificação do papel dos lipopetideos Pam 2 e Pam 3, evidenciou-se a perda óssea severa causada por esses componentes, com diferenciação de osteoclastos dependente da ativação e da presença do TLR2/MyD88, indução de citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL6) e regulação do RANKL (Kim *et al.*, 2013).

O Pam2CKS4 corresponde ao nome químico palmitoyl-2-Cys-Ser-(Lys)₄, consiste em um lipopeptídeo sintético reconhecido pelo TLR2, um potente indutor de reabsorção óssea. Ao comparar-se com um lipopolissacarídeo (LPS), o Pam2CKS4 consiste em um indutor sintético eficaz sobre o processo de inflamação e perda óssea, atuando na expressão de sinalizadores e consequente formação de osteoclastos (Kassem *et al.*, 2015). Estudos anteriores reforçam a ação do Pam2CSK4 na indução de reabsorção óssea e da osteoclastogênese, estimulando diretamente a ativação de células precursoras de osteoclastos e também na produção de precursores, ampliando o potencial osteoclastogênico (Souza *et al.*, 2020; Henning *et al.*, 2024).

Embora o lipopolissacarídeo (LPS) seja amplamente utilizado como Padrão Molecular Associado a Patógenos (PAMP), em modelos experimentais, devido à sua presença ubíqua em bactérias Gram-negativas e à reconhecida capacidade de ativação do TLR4 na destruição periodontal, outros componentes bacterianos também desempenham papel relevante na resposta inflamatória (Graves *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2020). O uso de componentes bacterianos isolados pode apresentar limitações, como exemplo, o LPS de *P. gingivalis* que pode variar significativamente entre diferentes fontes e lotes, devido à capacidade dessa bactéria de modificar seus PAMPs como mecanismo de evasão imunológica. Dessa forma, o uso de agonistas sintéticos de TLR2, como o PAM2CSK4, surge como uma alternativa mais padronizada e reprodutível para a indução da resposta inflamatória, permitindo maior controle experimental e consistência nos resultados (Souza *et al.*, 2020).

O uso do agonista sintético do receptor Toll-like 2 (TLR2), Pam2CSK4, demonstra elevada eficácia em modelos experimentais para induzir uma resposta inflamatória periosteal capaz de desencadear um processo paradoxal de modelagem óssea local. Segundo Henning *et al.* (2024), uma aplicação subcutânea única de Pam2CSK4 promove uma reabsorção óssea extensa, caracterizada pela formação excessiva de osteoclastos e erosões predominantemente na superfície pericraniana durante a fase inicial. No entanto, essa resposta anabólica local é acompanhada por efeitos sistêmicos catabólicos robustos, caracterizados por uma perda significativa de densidade mineral óssea (BMD) e de massa óssea trabecular em locais distantes, como o fêmur distal. Esse processo é mediado pelo aumento da expressão de RANKL (*Tnfsf11*) e da razão RANKL/OPG, que ativa genes de degradação da matriz como a catepsina K (*Ctsk*) e

TRAP (*Acp5*), resultando em um perfil puramente destrutivo nos ossos longos, sem evidências de reparo tecidual nesses locais distantes.

2.3 Aplicabilidade da Tanshinona na reabsorção óssea e o seu mecanismo de ação

A *Salvia Miltiorrhiza* uma erva utilizada na medicina tradicional chinesa isoladamente ou em combinação, foi reconhecida devido ao seu uso no tratamento de doenças ósseas. A sua ação potencial como agente antiosteoporótico desencadeou em estudos sobre sua atividade no processo de reabsorção óssea, em destaque a osteoporose (Kum; Kirchof; Luick; Heinrich.,2021; Wang *et al.*, 2024).

A composição fitoquímica da *Salvia Miltiorrhiza* é identificada com presença de mais de 100 compostos, classificados de acordo com sua solubilidade. A tanshinona consiste em um dos principais representantes do grupo de compostos lipossolúveis, com resultados oriundos do seu isolamento indicando, atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antifibróticas, antitumorais, antiosteoclastogênicas e osteogênese (Tang *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024 Sudha *et al.*, 2024).

Segundo uma revisão sistemática com objetivo de relatar os efeitos da tanshinona no sistema esquelético, com a busca de estudos em animais, in vitro e ensaios clínicos, foram avaliados 20 estudos para determinar a evidência sobre a ação do inibidor. Como resultado, foram encontradas evidências de alta qualidade demonstrando a sua eficácia na regulação da atividade osteoclástica, melhorando a reposição óssea e reduzindo as inflamações nas análises in vitro e in vivo (Ekeuku; Pang; Chin, 2021).

O potencial das tanshinonas lipofílicas é reconhecida como um potente inibidor da catpesina K, tratando a degradação de fibras de colágenos. O agente também foi identificado como possível regulador, no aumento da expressão dos genes Runx2, Osx, OCN e osteopontina (OPN), indicando um favorecimento na diferenciação de osteoblastos que são importantes na formação de matriz óssea (Wang *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2019).

De igual modo, o tipo tanshinona IIA sulfônicos sódico desenvolvido para aumentar a biodisponibilidade, foi indicado como um possível inibidor seletivo de catpesina K, com

aumento dos osteoblastos e possível redução dos osteoclastos. Outros 12 tipos como, T02, T05, T07, T08, T09, T11, T12, T17, T20, T23 e T27 a 10, também foram classificados como tanshinonas agentes anti-catepsina (Ekeuku; Pang; Chin, 2021; Wang *et al.*, 2024).

A T-IIA foi identificada como um possível inibidor de osteoporose, reduzindo a perda óssea induzida pela ovariectomia em um modelo experimental. Em estudo *in vitro* foi observado a inibição das vias NF- κ B, MAPKs e Akt e redução da expressão da catepsina K, fatores presentes na cascata de inflamação óssea, isto é, reduzindo a perda óssea, e sendo apontado mais uma vez como um possível agente inibidor em doenças ósseas induzidas por inflamação (Molon, 2025; Cheng *et al.*, 2018).

Outrossim, a investigação da aplicabilidade da T-IIA sobre a osteoporose, foi feita sobre modelos de camundongos diabéticos, sendo detectado a redução de níveis séricos, e melhoria na densidade mineral óssea trabecular. Os resultados podem apontar a possibilidade de aplicações em casos de outra doença óssea inflamatória, como a periodontite, e é importante ser ressaltado a relação da progressão da doença periodontal com a diabetes (Molon, 2025). Os efeitos da T-IIA foram estudados em um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura, com resultados demonstrando uma redução de osteoclastos e melhora na arquitetura óssea (Pavanelli *et al.*, 2025).

Ainda, o uso da T-IIA para o tratamento de osteólise em um modelo de calvária de camundongo, foi indicado como potencial agente terapêutico, promovendo equilíbrio sobre o RANKL/OPG, reduzindo então a reabsorção óssea. O efeito antirreabsortivo e anti-inflamatório sobre a artrite reumatoide também foi positivo, reduzindo a progressão da doença (Molon, 2025; Yao *et al.*, 2018; Panwar *et al.*, 2024).

Em continuidade, sobre o mecanismo de ação da TII-A, o mesmo é reconhecido por sua ação dual em doenças osteolísticas justamente por atuar na inibição da reabsorção óssea e na promoção da formação óssea (Molon, 2025). As evidências atuais revelam que sua ação na inibição óssea se deve a interferência na sinalização do RANK-RANKL, reduzindo a produção do RANKL por osteoblastos, aumentando também a expressão de osteoprotegerina (OPG), bloqueando vias de sinalização cruciais como NF- κ B, MAPK e Akt, o que suprime fatores de transcrição essenciais (c-Fos, NFATc1) e reduz a atividade de enzimas degradativas, como a catepsina K (Eueku *et al.*, 2021; Panwar *et al.*, 2024; Molon, 2025).

A formação óssea desencadeada pela TII-A se deve ao estímulo de células formadoras de osso, aumentando a diferenciação de osteoblastos, e elevando marcadores Runx2, fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OCN) que estão envolvidos na diferenciação osteogênica (Molon, 2025; Wang *et al.*, 2024). A diferenciação de osteoblastos desencadeada pela TII-A envolve as vias Wnt/ β -catenina e BMP-2, também rejuvenescendo células-tronco da medula óssea (BMSCs) ao reverter a hipermetilação do DNA e ativar o gene PHGDH (Phosphoglycerate Dehydrogenase). Somado a isso, suas potentes propriedades anti-inflamatórias, que reduzem citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de células Th17 sem causar imunossupressão sistêmica, reforçam seu potencial para tratar condições como artrite reumatoide, periodontite e osteoporose (Wang *et al.*, 2024; Panwar *et al.*, 2024)

Os estudos relatam a tanshinona IIA como um possível agente indutor sobre a osteoblastogênese e a osteogênese com ação dose-dependente. A sua seletividade de ação indica-se a necessidade de mais estudos específicos bem delineados e atuais, sobre a sua eficácia, que com a sua comprovação específica permita futuros ensaios clínicos com segurança para a tratativa de doenças ósseas (Ekeuku; Pang; Chin, 2021; Wang *et al.*, 2024).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da TII-A na inibição da reabsorção óssea causada por Pam2CSK4 em um modelo de calvária de camundongo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do Pam2CSK4 na indução de reabsorção óssea.
- Avaliar o efeito da TII-A na redução da reabsorção óssea.
- Identificar as alterações no tecido ósseo por meio de microtomografia computadorizada (MicroTC), através dos parâmetros microestruturais ósseos, volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), número de tableculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th) e separação trabecular (Tb.Sp).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo realizado tratou-se de um estudo experimental laboratorial in vivo e cego.

4.1 LOCAL DO ESTUDO E VIABILIDADE

O estudo experimental foi realizado no Instituto de Ciências Biológicas II, da Universidade Federal de Goiás (UFG), e a manipulação das substâncias na Faculdade de Odontologia (UFG).

A UFG ofereceu todos os recursos necessários para a condução de pesquisas com animais, incluindo: treinamento para os pesquisadores, biotério para a acomodação dos animais, distribuição dos animais. O estudo só foi iniciado após a aprovação da CEUA (nº011/2021).

Os insumos materiais, transporte e demais custos referentes a análise tomográfica foram fomentados pelos financiamentos CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), processo nº 405935/2023-4, Chamada nº 10/2023 e FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), por meio da Chamada Pública nº 21/2024 (Processo Administrativo nº AUX2024361000140).

4.2 MANEJO DOS ANIMAIS E TAMANHO DA AMOSTRA

Foram utilizados camundongos (C57BL/6, 30g, 6 semanas, machos), obtidos do Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), Centro Multiusuário de Produção e Experimentação Animal (CMPEA), sendo mantidos em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22° a 24°) e luminosidade (12h de ciclo claro). A adaptação dos animais ocorreu em um período de 7 dias antes da realização da intervenção.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno padrão para camundongos (30 x 20 x 13 cm) em gaiolas ventiladas com filtragem de ar.

A higienização das caixas e as suas respectivas trocas adjuntas do fornecimento de ração e troca de água foram realizadas duas vezes por semana, nas segundas-feiras e quinta-feira no período da manhã conforme as normas do biotério do ICBII. A serragem utilizada era trocada nos mesmos dias da higienização, e a alimentação constituída de ração para camundongo Nuvilab (Nuvital) com água fresca irrestrita para os camundongos.

Os animais foram alocados em três grupos experimentais ($n = 6$ por grupo). O tamanho amostral foi estabelecido com base em estudo prévio com delineamento metodológico semelhante (Cheng *et al.*, 2018). Adicionalmente, foi realizada análise de poder amostral utilizando o software G*Power 3.1 ($\alpha = 0,05$; poder = 80%; tamanho de efeito = 1,43).

O planejamento experimental seguiu o princípio ético da redução (Reduction), integrante dos 3Rs, garantindo o uso racional de animais sem prejuízo à robustez dos resultados.

4.3 EXPERIMENTAÇÃO

4.3.1 Procedimento Operacional Padrão da diluição das substâncias e da experimentação

Na Faculdade de Odontologia da UFG, foram preparados os materiais e as substâncias a serem utilizados na experimentação. Foram utilizados como materiais de estudo: injeção de Pam2CSK4 utilizando-se a seringa de insulina de 1ml, com a finalidade de estimular a formação de osteoclastos e reabsorção óssea in vivo conforme demonstrado previamente por Kassem *et al*, 2015. Além do Pam2CSK4, utilizou-se TII-A via oral com utilização de uma cânula de gavagem, com a administração seguindo a metodologia de Pawar et al, 2017. A diluição e preparo das substâncias estão apresentadas na tabela 1 e 2.

Quadro 1. Cálculo da diluição da TII-A, considerando a concentração inicial da substância e o volume final desejado, para obtenção da concentração experimental estabelecida no protocolo.

Quantidade diária para cada camundongo	Quantidade total de Tanshinona	Diluição
1,2mg	100mg	<p style="text-align: center;">100mg - 10mL de PBS</p> <p style="text-align: center;">Concentração: 10mg/mL</p> <p style="text-align: center;">Concentração individual: 1,2mg/120µl</p> <p style="text-align: center;">Cada camundongo recebeu: 120µl</p>

Fonte: Elaborada por Acioli, 2025.

1. No fluxo laminar, foram identificados todos os microtubos (1–6).
2. Foi adicionado 1 mL de PBS ao frasco contendo Tanshinona.
3. Esse volume (1 mL) foi transferido para um tubo Falcon contendo 9 mL de PBS, obtendo-se Tanshinona na concentração de 10 mg/mL.
4. Foram aliqotados 1,2 mL da solução em microtubos de 5 mL, totalizando seis alíquotas (uma para cada dia do experimento).
5. As amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; diariamente, um tubo foi retirado e transportado em gelo para utilização.

Quadro 2. Cálculo da diluição do Pam2CSK4, considerando a concentração inicial da substância e o volume final desejado, para obtenção da concentração experimental estabelecida no protocolo.

Quantidade para cada camundongo	Quantidade total de Pam2CSK4	Diluição
45µg	1mg	<p style="text-align: center;">1mg - 2,222mL de PBS</p> <p style="text-align: center;">Concentração: 45µg/100µl</p> <p style="text-align: center;">Cada camundongo recebeu: 100µl</p>

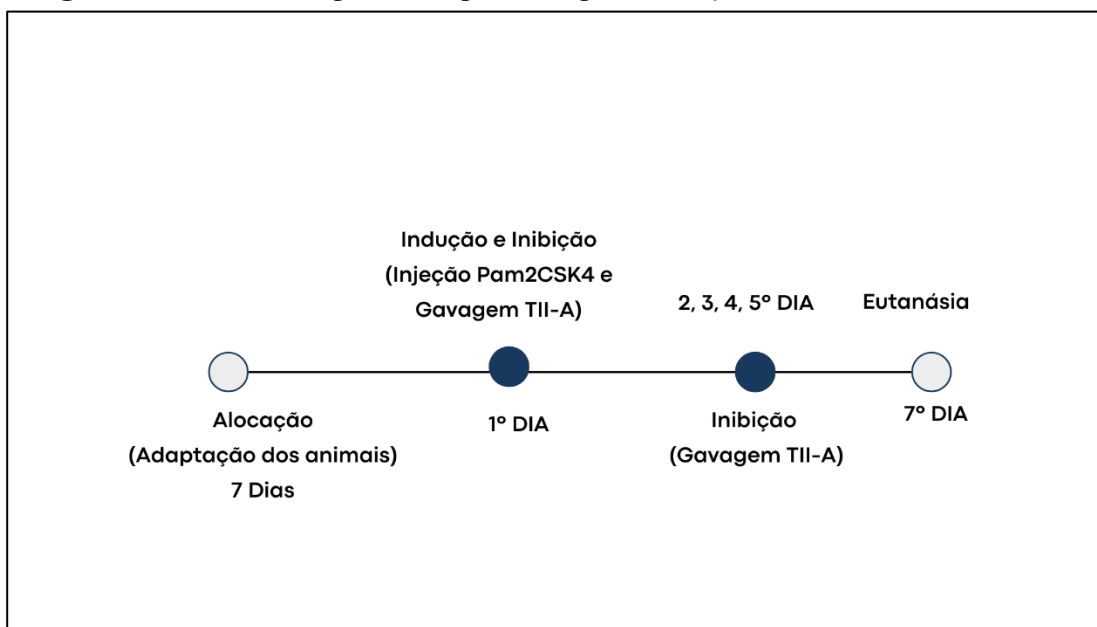
Fonte: Elaborado por Acioli, 2025.

1. Sob capela de fluxo laminar, foi adicionado 1 mL de PBS ao frasco contendo Pam2CSK4.
2. O volume obtido (1 mL) foi transferido para microtubo de 5 mL contendo 1,222 mL de PBS, obtendo-se Pam2CSK4 na concentração final de 450 µg/mL.
3. A amostra foi armazenada sob refrigeração (4 °C) para utilização no dia seguinte no experimento e transportada em gelo no momento do uso.

A experimentação foi planejada para ser realizada ao longo de 7 dias, período considerado adequado para a avaliação do processo inflamatório em sua fase aguda (Takao e Miyakawa, 2015; Henning *et al.*, 2024). Esse intervalo permite a análise de eventos iniciais da resposta inflamatória, como recrutamento celular e liberação de mediadores inflamatórios.

Adicionalmente, o delineamento experimental seguiu a metodologia descrita em estudos prévios com propostas semelhantes (Kassem *et al.*, 2015; Kwak *et al.*, 2008), garantindo a consistência e comparabilidade dos resultados obtidos. A cronologia do experimento, incluindo os períodos de indução e tratamento, está ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Linha do tempo das etapas de experimentação.



O delineamento experimental e a distribuição dos grupos foram realizados da seguinte forma:

Grupo controle: somente a injeção de solução salina (45 µg em cada camundongo) + gavagem com soro fisiológico.

Grupo Pam2CSK4: injeção de Pam2CSK4 (45 µg em cada camundongo) + gavagem com soro fisiológico.

Grupo TII-A: injeção de Pam2CSK4 (45 μg em cada camundongo) e gavagem com o inibidor TII-A (1200 μg em cada camundongo).

As etapas da experimentação são representadas no fluxograma a seguir (Figura 2).

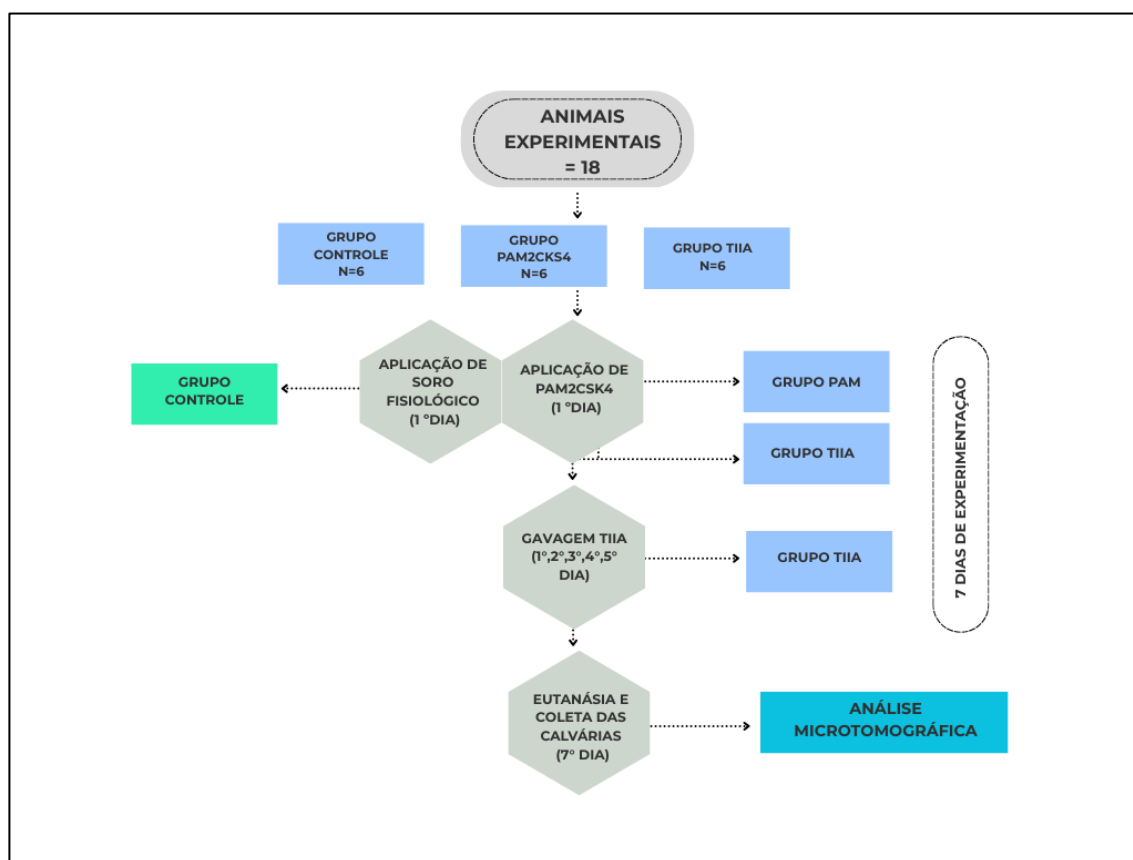


Figura 2. Representação em fluxograma das etapas da experimentação.

Com finalidade de cumprir os princípios dos 3Rs, em específico o refinamento (Refinement), foi adotado a administração de um analgésico para minimizar o desconforto e estresse dos animais. A utilização de anti-inflamatórios não foi adotada no presente estudo, uma vez que o objetivo experimental foi a indução e avaliação do processo inflamatório associado à reabsorção óssea. A dipirona utilizada foi proveniente

de formulação injetável comercial (500 mg/mL). A administração foi realizada via intraperitoneal em cada camundongo, aplicado 40 µL por animal (1x ao dia).

A escolha da dipirona (metamizol) como agente analgésico justifica-se por sua elevada eficácia e baixa toxicidade, apresentando um perfil farmacológico ideal para o estudo de processos inflamatórios (Santos *et al.*, 2014). O efeito analgésico da dipirona é independente de sua ação anti-inflamatória, uma vez que o fármaco reverte a hiperalgesia em doses significativamente menores do que as necessárias para uma supressão inflamatória plena. Portanto, o uso da dipirona permite o controle efetivo da dor e do desconforto animal sem mascarar ou interferir excessivamente nos mediadores e na dinâmica do processo inflamatório que constituem o objeto central de análise desta pesquisa (Santos *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2024)

4.3.2 Execução do 1º dia de experimentação

No primeiro dia realizou-se, a anestesia geral com o gás isoflurano para posterior injeção na região central do crânio, em direção a sutura sagital (Figura 2), após a aplicação do Pam2CSK4 (Figura 3), foi realizado a aplicação de 40 µL de dipirona por meio de injeção intraperitoneal, com a agulha angulada em um ângulo de 45° em relação ao abdômen de cada camundongo (Figura 4). Logo após os camundongos acordar da anestesia (em torno de 2min), a gavagem foi realizado, sendo administrado a TII-A ou soro fisiológico (Figura 5). A administração por gavagem oral foi realizada utilizando cânula adequada ao tamanho dos animais, previamente ajustada conforme a distância entre a cavidade oral e o estômago.

Os camundongos foram contidos manualmente, com estabilização da cabeça, e a cânula foi introduzida pela lateral da cavidade oral, deslizando suavemente sobre a língua até o esôfago, sem aplicação de força. A solução foi administrada de forma lenta e contínua, evitando refluxo, seguida da retirada cuidadosa da cânula. Após o procedimento, os animais foram observados quanto a possíveis sinais de desconforto ou alterações respiratórias.

Com finalidade de identificar os animais durante o experimento, os camundongos foram organizados e marcados por cores: vermelho para o grupo Pam2CSK4, azul para o

grupo Controle e preto para o grupo TII-A. A estratégia permitiu a rastreabilidade individual ao longo do estudo.



Figura 3. A. Painel de controle do vaporizador de isoflurano demonstrando fluxo de ar de 2,2 L/min e concentração ajustada para 8% durante a fase de indução anestésica. **B.** Anestesia inalatória com isoflurano sendo realizado em camundongo.

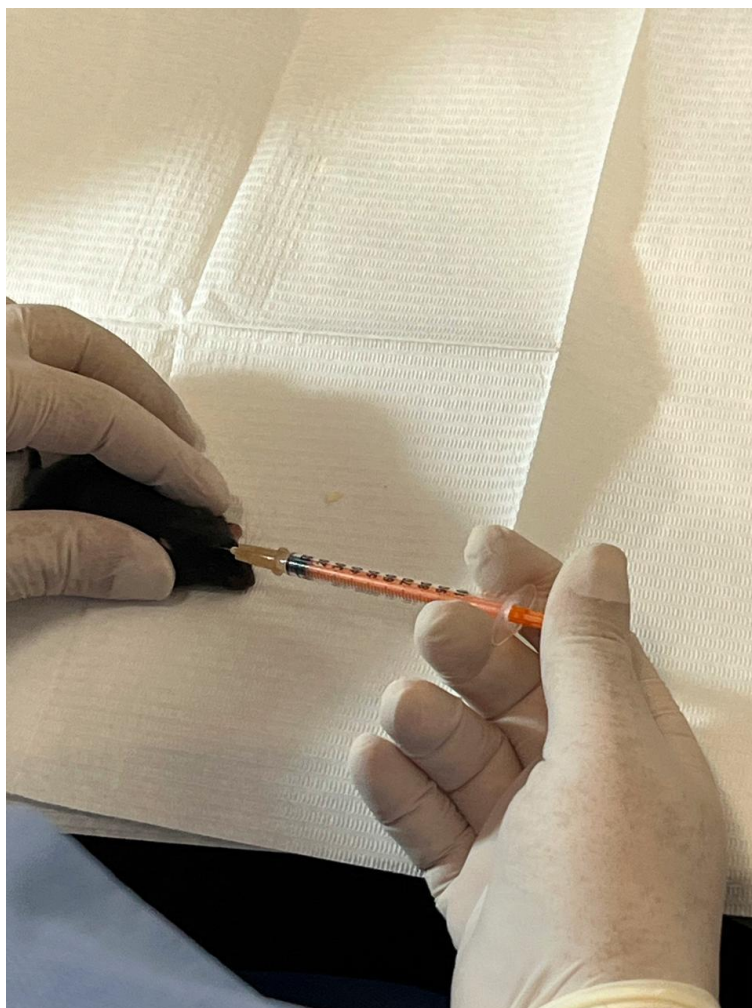


Figura 4. Injeção da substância Pam2CKs4 ou soro fisiológico no camundongo.



Figura 5. Administração do dipirona via intraperitoneal em camundongo.



Figura 6. Aplicação da TII-A via gavagem no camundongo.

4.3.3. Realização do 2, 3, 4 ° dia de experimentação

No segundo, terceiro e quarto dia de experimentação foi realizado a administração novamente da TII-A e soro fisiológico para o grupo controle, sendo feito novamente a aplicação do dipirona.

4.3.4 Procedimentos experimentais no 5º e 7º dia

No quinto dia os animais apresentaram uma recuperação significativa, sendo realizado somente as últimas gavagens. Após os dias de intervenção e dos cuidados pós-operatórios, no sétimo dia, os animais foram sacrificados e seguidamente a remoção da cabeça foi feita. As estruturas anatômicas foram preservadas em formalina tamponada a 10%. O processo de eutanásia foi realizado pelo deslocamento cervical. As carcaças para o descarte foram colocadas em saco plásticos e no freezer na sala de descarte e posteriormente feito a sanitização das gaiolas utilizadas.

4.4 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

As análises microtomográfica e estatística foram realizadas por avaliadores cegados quanto à alocação dos grupos experimentais, com o intuito de minimizar possíveis vieses na interpretação dos resultados.

Com a finalidade de avaliar a microarquitetura óssea, as amostras foram encaminhadas para a análise de microtomografia computadorizada (microCT) para a Faculdade de Odontologia na Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Araçatuba. Foi utilizado o equipamento SkyScan 1172, equipado com fonte de raios X de até 100 kV.

A reconstrução das projeções foi realizada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), sendo utilizado o software NRecon (Bruker), aplicado os parâmetros padronizados do equipamento (Figura 10). A reorientação das amostras nos planos axial, sagital e coronal foi realizada no software DataViewer (Bruker). O VOI (Volume of Interest) e o ROI (Region of Interest) foram definidos no software, sendo estes, diâmetro de 5 mm e altura correspondente a 20 slices. A análise quantitativa do tecido ósseo foi realizada no software CTAn (Bruker).

A segmentação das imagens, utilizou-se limiar de binarização entre 80 e 255 (escala de cinza). Os parâmetros morfométricos ósseos foram obtidos a partir do VOI previamente delimitado.

Foram avaliados o volume ósseo (BV), que representa a quantidade absoluta de tecido ósseo mineralizado; a fração de volume ósseo (BV/TV), que corresponde à proporção de osso em relação ao volume total analisado; a espessura trabecular (Tb.Th), que expressa a espessura média das trabéculas; o número trabecular (Tb.N), que indica a quantidade de trabéculas por unidade de comprimento; e a separação trabecular (Tb.Sp), que representa a distância média entre as trabéculas. Em conjunto, esses parâmetros permitem avaliar a quantidade e a microarquitetura do tecido ósseo.

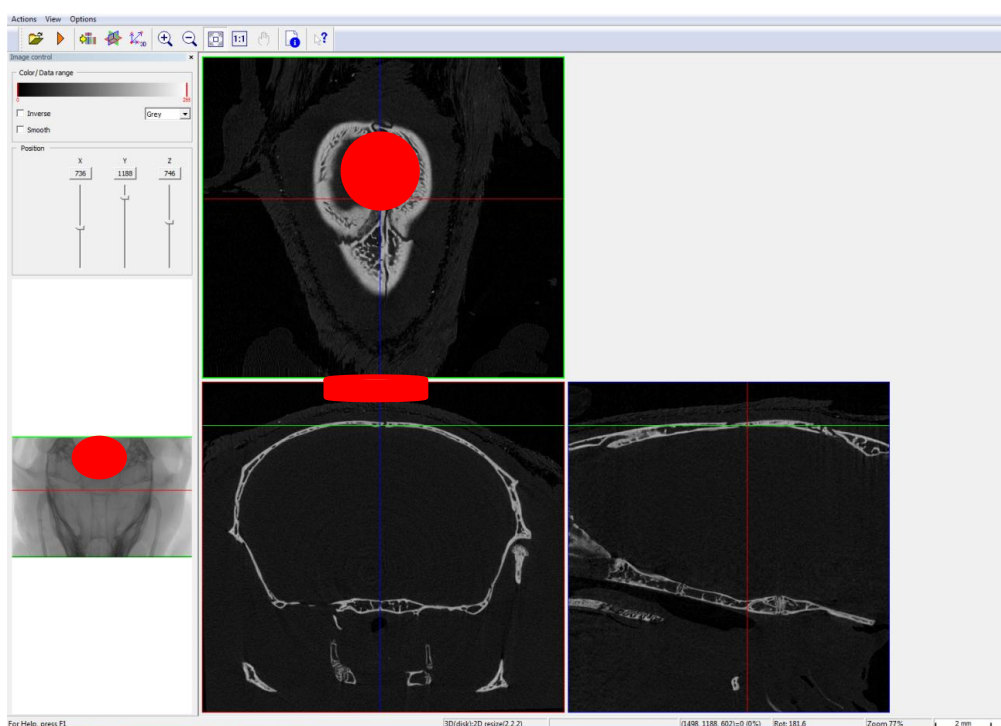


Figura 7. Imagens reconstruídas por microtomografia computadorizada (microCT) da estrutura óssea do crânio do camundongo em diferentes planos (corte transversal axial evidenciando a arquitetura óssea interna. Painel inferior esquerdo: corte coronal mostrando a espessura e continuidade do osso craniano. Painel inferior direito: corte sagital detalhando a morfologia óssea ao longo do eixo anteroposterior. As linhas coloridas indicam os planos de corte cruzados para referência espacial.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No que se refere, a avaliação para a comparação dos parâmetros de microarquitetura óssea entre os três grupos experimentais (Controle, Pam2CSK4 e TIIA), foi empregada a análise de variância (ANOVA one-way), uma vez que se tratava da comparação de médias entre mais de dois grupos independentes. Previamente à aplicação do teste, foram verificados os pressupostos de normalidade da distribuição dos dados, por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados indicando normalidade na distribuição, teste de ANOVA foi considerada o método estatístico mais adequado. Quando identificada diferença estatisticamente significativa, aplicou-se o teste post hoc de Tukey para a realização das comparações múltiplas entre os grupos, permitindo a identificação específica das diferenças intergrupos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados no software IBM SPSS Statistics for Windows (versão 27.0; IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA

No que diz respeito aos resultados tomográficos, a reconstrução tridimensional evidenciou diferenças entre os grupos experimentais. No grupo controle, observou-se preservação da integridade da calota craniana, com superfície óssea contínua e ausência de áreas de reabsorção (**Imagem 8**).

Em contrapartida, nos grupos com reabsorção óssea induzida, foram identificadas múltiplas áreas de perda óssea, caracterizadas por perfurações distribuídas de forma difusa e padrão irregular. Nos espécimes tratados com TIIA, não foi observada redução dessas áreas, indicando ausência de efeito do tratamento na contenção da reabsorção óssea (**Imagem 9 e 10**).

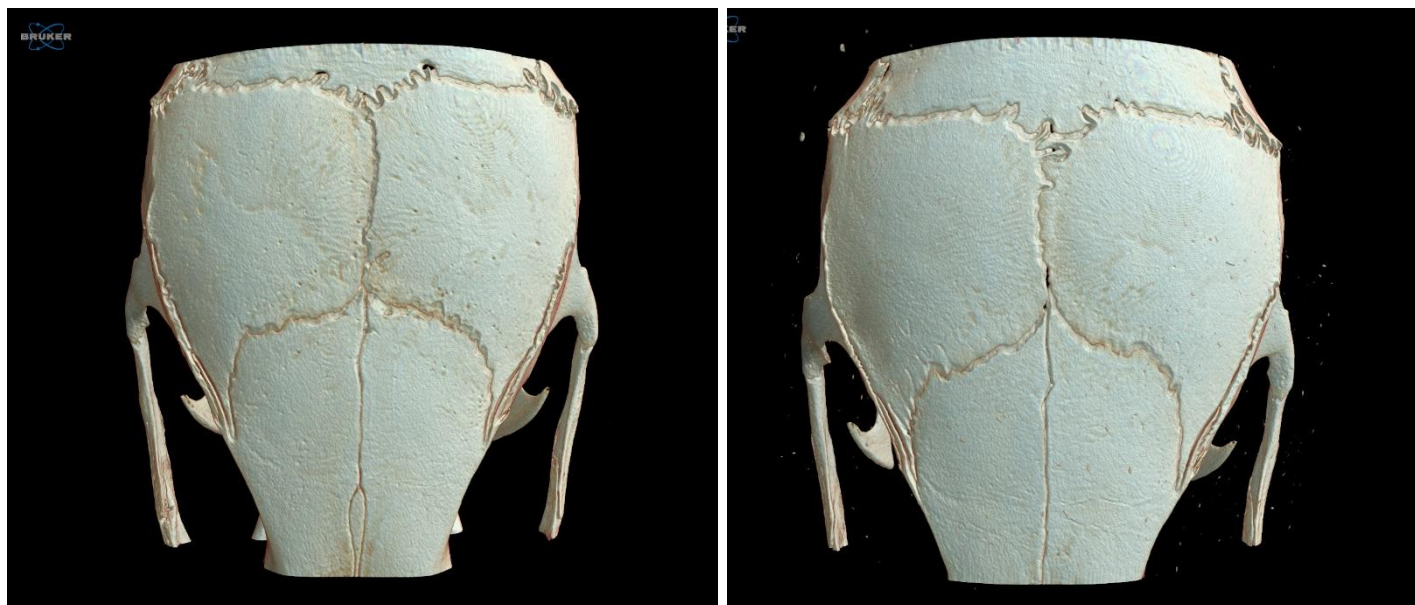


Figura 8. Vista superior da calota craniana evidenciando integridade da superfície óssea, sem presença de áreas de reabsorção óssea. A figura apresenta duas amostras do mesmo grupo experimental.

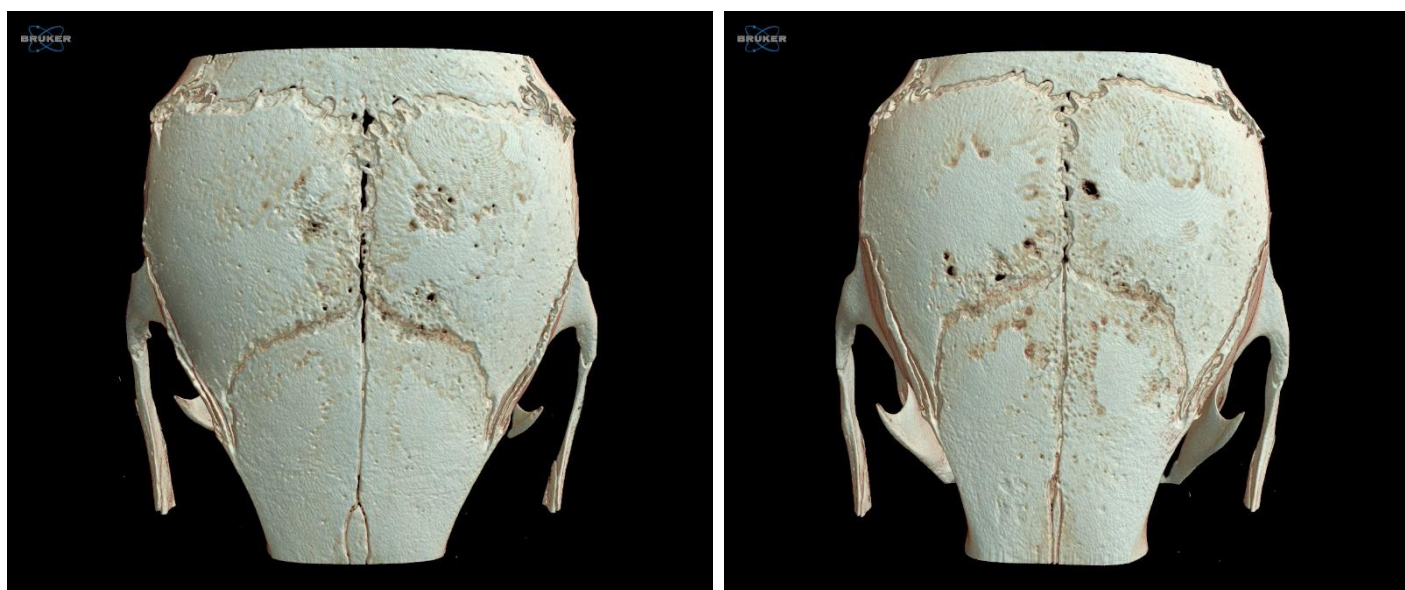


Figura 9. Vista superior da calota craniana evidenciando múltiplas áreas de reabsorção óssea distribuídas difusamente. A figura apresenta duas amostras do mesmo grupo experimental (PAM2CSK4), ambas exibindo padrão morfológico semelhante de reabsorção óssea.

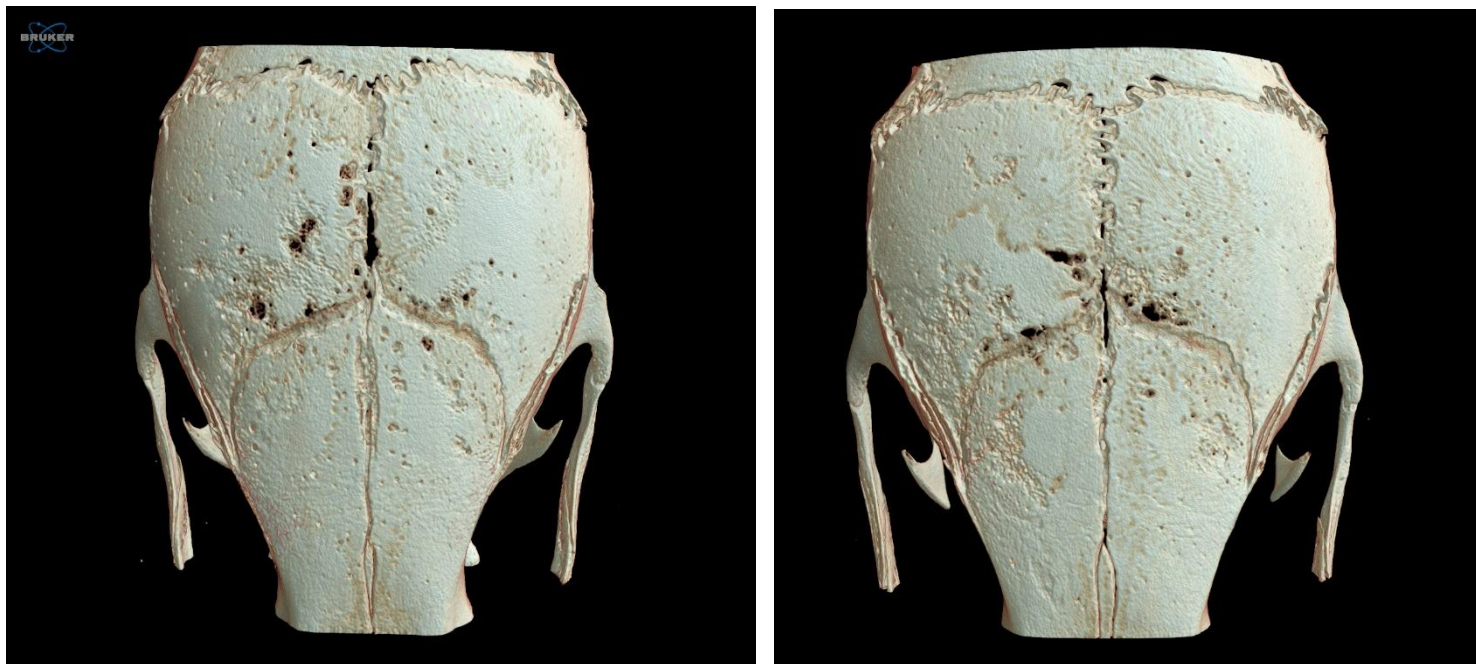


Figura 10. Vista superior da calota craniana evidenciando múltiplas áreas de reabsorção óssea distribuídas difusamente. A figura apresenta duas amostras do grupo experimental tratado com TIIA.

Em relação aos parâmetros microtomográficos foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais e controle em parte dos parâmetros avaliados, conforme apresentado na tabela 3.

No parâmetro volume ósseo (BV), ao comparar com o grupo controle, foi observado uma diminuição significativa no grupo Pam2csk4 com valor de p indicando $p = 0,025$, e também no grupo TII-A com $p = 0,012$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Pam2csk4 e TII-A ($p = 0,897$).

No parâmetro porcentagem de volume ósseo (BV/TV), ao comparar com o grupo controle, foi observado uma diminuição significativa no grupo Pam2csk4 com valor de p indicando $p = 0,025$, e também no grupo TII-A com $p = 0,012$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Pam2csk4 e TII-A ($p = 0,897$).

No parâmetro de espessura trabecular (Tb.Th), ao comparar o grupo controle com os grupos Pam2CSK4 e TII-A, foi observado uma diminuição significativa no grupo Pam2csk4 com valor de p indicando $p < 0,001$, e também no grupo TII-A com $p = 0,012$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Pam2csk4 e TII-A ($p = 0,054$).

No parâmetro de número de trabéculas (Tb.N) ao comparar o grupo controle com o grupo Pam2csk4 e TII-A, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, com o valor de $p= 0,059$.

No parâmetro de separação trabecular (Tb.Sp) ao comparar o grupo controle com o grupo Pam2csk4 e TII-A, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, com o valor de $p= 0,256$

Tabela 1. Comparação dos parâmetros de microarquitetura óssea obtidos por micro-CT entre os grupos Controle, PAM2CSK4 e TIIA.

Variável	Controle	PAM2CSK4	TIIA	<i>p</i>
BV (mm ³)	1,266 ± 0,110 ^a	1,060 ± 0,129 ^b	1,023 ± 0,210 ^b	0,006*
BV/TV (%)	35,27 ± 3,066 ^a	29,52 ± 3,608 ^b	28,50 ± 5,871 ^b	0,006*
Tb.Th (mm)	0,088 ± 0,003 ^a	0,782 ± 0,002 ^b	0,082 ± 0,052 ^b	<0,001*
Tb.N (1/mm)	4,00 ± 0,238	3,768 ± 0,398	3,44 ± 0,661	0,059*
Tb.Sp (mm)	0,136 ± 0,004	0,141 ± 0,008	0,142 ± 0,010	0,256*

Volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th) e separação trabecular (Tb.Sp). **Teste ANOVA one-way e teste post hoc de tukey*. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Fonte: autoria própria

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da reabsorção óssea induzida pela aplicação da lipoproteína Pam2CKK4, além de avaliar o potencial do antirreabsortivo da tanshinona (TII-A). De maneira geral, o Pam2CKK4 foi eficaz em promover alterações relacionadas à reabsorção óssea inflamatória nas calvárias dos animais avaliados. Contudo, a TII-A não demonstrou efeito antirreabsortivo significativo nas condições estabelecidas neste estudo.

A literatura revela o Pam2CKK4 como um potente estimulador de atividade catabólica óssea, com indução da osteoclastogênese localmente e sistematicamente, desencadeando na reabsorção óssea (Kassem et al., 2015, Souza *et al.*, 2019; Henning *et al.*, 2024). Os resultados da avaliação da microarquitetura óssea por meio da microtomografia computadorizada dos grupos experimentais (Pam2CKK4 e TII-A) ao comparar com o grupo controle, evidenciou-se diferenças significativas, na estrutura óssea da calvária, com presença de reabsorção, em concordância com o que é evidenciado na literatura.

A implementação do Pam2CKK4 somente com uma única injeção é apresentada na literatura como um estímulo único e suficiente para desencadear no processo de reabsorção óssea robusta (Kassem *et al.*, 2015; Henning *et al.*, 2024). No presente estudo a única injeção aplicada no dia 1 de experimentação reforça a eficácia do Pam2CKK4 na indução de uma resposta inflamatória que ativa as células osteoclastos, resultando na redução de volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV) e da espessura trabecular que apresentaram diferença significativa nos grupos Pam2CKK4 e TII-A.

No estudo de Henning (2024) é evidenciado que a inflamação induzida pelo Pam2CKK4 pode desencadear tanto no aumento da reabsorção óssea, quanto no aumento da formação óssea, possivelmente associada ao aumento da proliferação celular, sendo identificado como uma inibição transitória, e como um processo inflamatório com a capacidade de induzir a estimulação da formação óssea, após 7 dias após a aplicação.

No presente estudo, devido ao período estabelecido de 7 dias de experimentação, foi observado uma redução do tecido ósseo nas calvárias, achado consistente com os resultados descritos por Henning e autores (2024), que demonstraram que durante os

primeiros 7 dias, o processo inflamatório é marcado predominantemente por uma reabsorção óssea robusta, especialmente na superfície pericraniana, correspondente ao local da injeção do Pam2CKS4. Nesse contexto, a intensa atividade catabólica osteoclástica observada na fase inicial tende a predominar sobre os eventos reparativos, enquanto, posteriormente, mecanismos de neoformação óssea podem interferir na avaliação da reabsorção óssea induzida.

No presente estudo, a administração de Pam2csk4 resultou em uma redução significativa do volume ósseo trabecular (BV/TV) nos grupos experimentais, sem, contudo, impactar de forma mensurável o número (Tb.N) ou a separação das trabéculas (Tb.Sp). Esses achados sugerem que a perda óssea observada ocorreu predominantemente por afinamento trabecular, em vez da perda de conectividade da rede óssea. Esse padrão difere daquele descrito no modelo clássico de osteoporose induzida por ovariectomia (OVX), no qual a redução do volume ósseo geralmente é acompanhada por diminuição do número de trabéculas e aumento da separação entre elas (Panwar *et al.*, 2017).

A preservação da arquitetura trabecular, apesar da redução do volume ósseo, pode estar relacionada ao mecanismo inflamatório induzido pela ativação do TLR2. O Pam2csk4 é capaz de aumentar a expressão de RANKL e a razão RANKL/OPG, favorecendo a diferenciação e a atividade osteoclástica; Dessa forma, ocorre um aumento da reabsorção óssea distribuída ao longo das superfícies trabeculares, resultando em perda de massa óssea sem comprometimento imediato da conectividade estrutural ((Kassem *et al.*, 2015; Henning *et al.*, 2024).

Além disso, considerando que a perda de conexões trabeculares representa um evento mais tardio no processo de reabsorção óssea, os resultados comprovam que o protocolo capturou a fase inicial da perda óssea inflamatória, onde o afinamento das trabéculas precede a desestruturação completa da rede trabecular (Henning *et al.*, 2024).

Segundo Liu *et al* (2024), os estudos clínicos envolvendo tanshinonas apresentam importantes limitações metodológicas, incluindo curta duração do tratamento, pequeno número amostral e ausência de grupos controle placebo, fatores que comprometem a robustez das evidências relacionadas à eficácia da substância. Nesse contexto, embora o presente estudo também tenha sido conduzido em curto período experimental, a definição de sete dias foi estabelecida com o objetivo de avaliar predominantemente a fase inicial

de reabsorção óssea induzida pelo Pam2CSK4, evitando possíveis interferências de eventos tardios de neoformação óssea descritos na literatura.

No que se refere aos resultados do grupo experimental TII-A, não foi identificado diferença significativa ao comparar grupo Pam2CSK4 não submetido ao tratamento reabsortivo, indicando que o a TII-A não foi capaz de reestabelecer os parâmetros de microarquitetura avaliados. Estudos prévios demonstram que a biodisponibilidade das tanshinona são limitadas quando administradas via oral, possivelmente em decorrência da baixa solubilidade da substância, e baixa absorção no fígado e intestino (Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Dessa forma, tais características podem ter limitado a efetividade da TII-A no presente estudo.

Devido à sua natureza lipofílica, a garantia que a TIIA permaneça em concentrações terapêuticas nos tecidos ósseos ou articulares ainda consiste em um desafio, sendo buscado derivados de tanshinona solúveis em água (Eukeku *et al.*, 2021; Molon, 2025). A ação da TII-A é reconhecida na literatura como dose-dependente, e o possível aumento da dosagem para compensar a baixa absorção apresenta limitações, devido ao potencial toxicidade em doses elevadas, que têm sido associadas a efeitos tóxicos, incluindo citotoxicidade em células humanas, além de malformações embrionárias e cardiotoxicidade observadas em modelos experimentais *in vivo* (Yang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2017).

Adicionalmente, evidências da literatura indicam que, em alguns modelos inflamatórios, a TII-A promove apenas inibição parcial da expressão de citocinas pró-inflamatórias, com reduções entre 40% e 60% (Kwak *et al.*, 2008; Panwar *et al.*, 2024; Molon, 2025). Considerando a intensidade da indução inflamatória promovida pelo Pam2CSK4, tal efeito modulador pode ter sido insuficiente para impedir de maneira significativa a progressão da reabsorção óssea observada neste experimento.

Em síntese, embora a TII-A apresente propriedades anti-inflamatórias e osteoprotetoras descritas na literatura, ainda existem limitações importantes relacionadas às suas propriedades farmacocinéticas que restringem a consolidação de evidências clínicas robustas acerca de sua eficácia. A rápida eliminação plasmática da substância, além de dificuldades na manutenção de concentrações terapêuticas estáveis sem atingir níveis citotóxicos, são fatores que podem limitar sua aplicabilidade terapêutica. Nesse

contexto, os achados do presente estudo reforçam a necessidade de investigações adicionais, especialmente com protocolos experimentais mais amplos e avaliações farmacodinâmicas mais detalhadas, para melhor compreensão dos efeitos da TII-A sobre a reabsorção óssea inflamatória induzida em específico pelo Pam2CKS4.

7. CONCLUSÃO

O modelo experimental induzido por Pam2CSK4 foi eficaz em promover alterações relacionadas à reabsorção óssea nas calvárias dos animais avaliados. Contudo, a TII-A não demonstrou efeito antirreabsortivo significativo nas condições estabelecidas neste estudo. Os achados identificados na análise microtomográfica com relação as alterações na microarquitetura óssea no estudo, ressaltam a complexidade da modulação farmacológica da perda óssea inflamatória e reforçam a necessidade de futuras investigações para melhor elucidação do potencial terapêutico da substância estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREEV, D.; KACHLER, K.; SCHETT, G.; BOZEC, A. Rheumatoid arthritis and osteoimmunology: the adverse impact of a deregulated immune system on bone metabolism. *Bone*, v. 162, p. 116468, 2022.

CHEN, Z. et al. HGF aggravated periodontitis-associated gut barrier and microbial dysfunction: implications for oral-gut axis regulation. *Biology*, v. 14, p. 496, 2025.

CHENG, L. et al. Tanshinone IIA attenuates osteoclastogenesis in ovariectomized mice by inactivating NF- κ B and Akt signaling pathways. *American Journal of Translational Research*, v. 10, n. 5, p. 1457–1468, 2018.

DAI, R. et al. Cathepsin K: the action in and beyond bone. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, 2020.

DE MOLON, R. S.; DE AVILA, E. D.; CIRELLI, J. A. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, v. 4, n. 4, p. 211–218, 2013.

DE MOLON, R. S. Therapeutic potential of tanshinones in osteolytic diseases: from molecular and cellular pathways to preclinical models. *Dentistry Journal*, v. 13, n. 7, p. 309, 2025.

DOS SANTOS, G. G. et al. The analgesic effect of dipyron in peripheral tissue involves two different mechanisms: neuronal K(ATP) channel opening and CB1 receptor activation. *European Journal of Pharmacology*, v. 741, p. 124–131, 2014.

EKEUKU, S. O.; PANG, K.-L.; CHIN, K.-Y. The skeletal effects of tanshinones: a review. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2319, 2021.

GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Frontiers of Oral Biology*, v. 15, p. 117–132, 2012.

HASCOET, E. et al. New insights into inflammatory osteoclast precursors as therapeutic targets for rheumatoid arthritis and periodontitis. *Bone Research*, v. 11, p. 26, 2023.

JIANG, Y. et al. Comparison of red-complex bacteria between saliva and subgingival plaque of periodontitis patients: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021.

KASSEM, A. et al. *Porphyromonas gingivalis* stimulates bone resorption by enhancing RANKL through activation of toll-like receptor 2 in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 33, p. 20147–20158, 2015.

KIM, J. et al. Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 28, n. 11, p. 2381–2391, 2013.

KRONEMBERGER, G. S. et al. A synergic strategy: adipose-derived stem cell spheroids seeded on 3D-printed PLA/CHA scaffolds implanted in a bone critical-size defect model. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 14, n. 12, p. 555, 2023.

KWAK, H. et al. Tanshinone IIA suppresses inflammatory bone loss by inhibiting the synthesis of prostaglandin E2 in osteoblasts. *European Journal of Pharmacology*, v. 601, n. 1–3, p. 30–37, 2008.

LIN, J. et al. Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKL-dependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 10, p. 4127–4134, 2014.

LIU, N. et al. Metamizole outperforms meloxicam in sepsis: insights on analgesics, survival and immunomodulation in the peritoneal contamination and infection sepsis model. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1432307, 2024.

LIU, T. et al. Tanshinone IIA promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK1/2-dependent Runx2 induction. *American Journal of Translational Research*, v. 11, n. 1, 2019.

MOLON, R. S. et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *Journal of Periodontology*, v. 85, n. 3, p. 465–477, 2014.

PALM, E. et al. The role of toll-like and protease-activated receptors in the expression of cytokines by gingival fibroblasts stimulated with the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *Cytokine*, v. 76, n. 2, p. 424–432, 2015.

PANWAR, P. et al. An ectosteric inhibitor of cathepsin K inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 32, n. 12, p. 2415–2430, 2017.

PANWAR, P.; ANDRAULT, P. M.; SAHA, D.; BRÖMME, D. Immune regulatory and anti-resorptive activities of tanshinone IIA sulfonate attenuates rheumatoid arthritis in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 181, n. 24, p. 5009–5027, 2024.

PEREIRA, H. F. et al. Scaffolds and coatings for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 31, n. 3, 2020.

SANTOS, A. F. M. et al. Optimal parameters of laser therapy to improve critical calvarial defects. *Frontiers in Physiology*, v. 13, 2022.

SOUZA, J. A. C. et al. Pam2CSK4 (TLR2 agonist) induces periodontal destruction in mice. *Brazilian Oral Research*, v. 34, 2020.

TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 4, p. 1167–1172, 2015.

TAKEUCHI, O. et al. Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 2, p. 554–557, 2000.

TRARES, K.; ACKERMANN, J.; KOCH, I. The canonical and non-canonical NF- κ B pathways and their crosstalk: a comparative study based on Petri nets. *Biosystems*, v. 211, p. 104564, 2022.

WANG, L. et al. *Salvia miltiorrhiza* in osteoporosis: a review of its phytochemistry, traditional clinical uses and preclinical studies (2014–2024). *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, p. 1483431, 2024.

WANG, T. et al. Evaluation of Tanshinone IIA developmental toxicity in zebrafish embryos. *Molecules*, v. 22, p. 660, 2017.

XU, S. et al. Associations between osteoporosis and risk of periodontitis: a pooled analysis of observational studies. *Oral Diseases*, v. 27, n. 2, p. 357–369, 2020.

YANG, L.-J. et al. Tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* elicits the cell death of human endothelial cells. *Journal of Biomedical Science*, v. 12, p. 347–361, 2005.

YAO, J. et al. Tanshinone IIA protects against polyethylene particle-induced osteolysis response in a mouse calvarial model. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 11, n. 9, p. 4461–4471, 2018.

ZHANG, J. et al. A mechanistic study of the intestinal absorption of cryptotanshinone, the major active constituent of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 317, p. 1285–1294, 2006.

ZHANG, M. et al. An update on periodontal inflammation and bone loss. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1385436, 2024.

ZHANG, Y. et al. Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 13621–13666, 2012.