

EFICÁCIA E SEGURANÇA DE *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EM RATAS.

Jordânia Marques de Oliveira¹; Débora da Silva Freitas Ribeiro²; Livia Cunha Rios³; Samuel Mateus Pereira Filho⁴; Hellíada Vasconcelos Chaves⁵; Vicente de Paulo Teixeira Pinto⁶.

RESUMO:

A periodontite é um processo inflamatório crônico que acomete os tecidos de sustentação dos dentes caracterizada por extensa reabsorção óssea alveolar. *Cimicifuga racemosa* (Cr) é uma planta herbácea, pertencente à família Ranunculaceae, originária do Canadá e da costa atlântica dos Estados Unidos, sendo comumente usada na medicina tradicional como agente analgésico, anti-inflamatório e para o tratamento dos sintomas da menopausa. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia de Cr na perda óssea alveolar aos 11 dias de periodontite em ratas e a segurança desse tratamento. **METODOLOGIA:** A periodontite (PE) foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) nos molares superiores de ratas *Wistar* (180-200g). Os animais foram pesados diariamente, sendo eutanasiados aos 11 d após a indução da PE. Grupos foram tratados (*per os*) diariamente, durante 11 dias, com Cr (0,1; 1 ou 10 mg/kg). O grupo controle foi submetido à indução da PE e tratados (*per os*) diariamente, durante 11 dias, com o veículo (salina). Após a eutanásia, sob anestesia, as hemiarcadas foram removidas e coradas com azul de metileno (1%) e a perda óssea avaliada por meio do software Image J®. Para avaliar a segurança da Cr amostras de sangue periférico foram coletadas para dosagem de ALT/AST, Fosfatase Alcalina e Creatinina. **RESULTADO:** Cr (1 ou 10 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) a perda óssea alveolar ($1,62 \pm 0,36$ e $1,20 \pm 0,41$, respectivamente), em relação ao grupo controle ($3,34 \pm 0,38$); não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os níveis séricos de ALT/AST, creatinina e fosfatase alcalina total entre grupos tratados e controle. **CONCLUSÃO:** Cr é eficaz e segura na periodontite em ratas.

PALAVRAS-CHAVE: *Cimicifuga racemosa*, Periodontite, Reabsorção Óssea.

Introdução

A periodontite é um processo inflamatório crônico que acomete os tecidos de sustentação dos dentes caracterizada por infiltrado celular inflamatório intenso e extensa reabsorção óssea. Representa a principal causa de perda de dentes em adultos, sendo considerada, portanto um grave problema de saúde pública, resultando em diminuição da qualidade de vida dos pacientes (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

De fato, a etiopatogenia da periodontite é complexa e, provavelmente, multifatorial, destacando-se a presença do agente infeccioso, placa bacteriana, e a resposta inflamatória e imune do hospedeiro, com a participação de mediadores inflamatórios. Neste sentido, o nosso grupo tem demonstrado nos últimos anos que citocinas, além das vias da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e hemioxigenase-1 (HO-1) estão envolvidas com o dano tissular e a perda de função que caracterizam o curso evolutivo da periodontite (LIMA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2009)

Apesar destes achados, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis atualmente é curativa, limitando-se a aliviar os sinais/sintomas da doença. A identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo, refletindo em uma melhor qualidade de vida da população.

Cimicifuga racemosa (Cr) é uma planta herbácea, pertencente à família das Ranunculáceas, originária do Canadá e costa atlântica dos Estados Unidos. Cresce cerca de 1-3 metros, geralmente encontrada em bosques com solos ricos em húmus e ladeiras com pouca vegetação, possuindo flores brancas de aroma fétido. Sua denominação genérica provém do latim “*cimicis y fugio*”, que significa “insetos em fuga”, em virtude da crença que seu aroma repelia os insetos (BORRELLI AND ERNST, 2008). Alguns estudos demonstram que o extrato dessa planta tem ações analgésica e anti-inflamatória, tendo efeito inibitório sobre a bradicinina e histamina (SUNG –JIN KIM AND MI-SUN KIM, 2000). Além disso, considerando-se que as etapas para o desenvolvimento de um novo fármaco, da bancada do pesquisador até a prateleira da farmácia levam em média de 10 a 15 anos, é lícito enfatizar que *Cimicifuga racemosa* já está disponível no mercado, sob a forma de comprimidos, sob o nome fantasia de Aplause® (Laboratório Marjan), sendo indicado para alívio dos sinais/sintomas da menopausa.

Considerando-se o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia e segurança da Cr na perda óssea alveolar aos 11 dias de periodontite em ratas.

METODOLOGIA

Foram utilizados 30 ratas *Wistar* fêmeas (180-200g) provenientes do Biotério Central do *Campus* do Pici. Os animais foram mantidos em caixas de plástico com livre acesso à água e comida a uma temperatura média de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ obedecendo a ciclos de claro-escuro de 12h. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo 52/2012).

Os animais foram divididos em cinco grupos de 6 animais cada e pré-tratados com salina (veículo) ou com Cr (0,1;1 ou 10 mg/kg). O grupo o *naive* representa animais não submetidos a qualquer manipulação. Após 30 min do tratamento os animais foram anestesiados (i.p.) com tribromoetanol 2,5% (1ml/100g). A periodontite experimental (PE) foi induzida através da colocação cirúrgica de um fio de náilon (3-0) na cervical do segundo molar superior esquerdo. Após a indução da PE, os animais foram pesados e tratados com Cr (0,1;1 ou 10 mg/kg) ou salina, diariamente durante 11 dias.

Após 11 dias da indução da PE, os animais foram eutanasiados, sob anestesia, e as hemiarcadas foram removidas, dissecadas, fixadas em formol 10% durante 24 horas e coradas em azul de metileno 1%, para posterior análise morfométrica. Após esses procedimentos as hemiarcadas foram montadas em cera de abelha (cor vermelha), fotografadas e analisadas por meio do software Image J®. A medida da reabsorção óssea alveolar foi feita subtraindo a área total da hemiarcada esquerda (com ligadura) da hemiarcada direita (sem ligadura). Um periodontista experiente (A.A.R.S) que desconhecia o protocolo de tratamento fez as medições. Ademais, aos 11 dias da PE, amostras de sangue periférico foram colhidas, centrifugas e o plasma armazenado (-20°C) para posteriores dosagens bioquímicas (ALT, AST, creatinina e fosfatase alcalina total).

RESULTADOS

Os animais submetidos à indução da PE apresentaram perda óssea alveolar significativa ($p<0,05$), em relação ao grupo controle. A permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a periodontite reproduzindo os principais sinais clínicos da doença em humanos, tais como: reabsorção óssea, exposição alveolar de raiz e perda de contato interdental.

A análise morfométrica demonstrou redução da perda óssea alveolar nos grupos tratados com Cr (1 ou 10 mg/kg) ($1,62\pm 0,36$ e $1,20\pm 0,41$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle ($3,34\pm 0,38$).

Além disso, Cr (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não afetou ($p < 0,05$) os níveis séricos de creatinina, assim como os níveis séricos das enzimas hepáticas (AST, ALT e Fosfatase Alcalina Total), quando comparado aos animais controle.

DISCUSSÃO

Estudos recentes sobre a patogênese da periodontite sugerem que a destruição dos tecidos de suporte e revestimento dos dentes, com a consequente perda dentária, é o resultado de interações entre patógenos bacterianos específicos e seus produtos presentes no biofilme bacteriano, fatores que dificultem a remoção desta placa bacteriana e a resposta inflamatória e imune do hospedeiro (MADIANOS *et al.*, 2005). No entanto, o papel exato de cada um desses fatores ainda carece de maiores elucidações.

No presente estudo foi demonstrado que a indução da periodontite através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares promoveu extensa reabsorção óssea alveolar após 11 dias. De fato, o uso da ligadura de náilon possui um papel fundamental para o início da periodontite experimental, contribuindo para a retenção do biofilme bacteriano e ativação da resposta imune-inflamatória do hospedeiro, determinando extensa perda óssea alveolar (LIMA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2000; AZOUBEL *et al.*, 2007). Nosso grupo já demonstrou que a perda óssea alveolar nesse modelo tem início a partir do 3º dia após a indução da periodontite, atingindo o máximo aos 11 dias, e mantendo-se na mesma magnitude até o 14º dia, com menor atividade osteoclástica neste intervalo de tempo, quando comparado aos 11 dias (SOUZA, 2011). Entretanto, embora se observe resolução parcial do processo inflamatório aos 14 dias, a perda óssea alveolar não é revertida, persistindo o dano aos tecidos periodontais, com destruição do processo alveolar, presença de bolsas periodontais profundas, mobilidade dentária, resultando em perda de função e, na grande maioria dos casos, em exfoliação dos dentes afetados. Esses achados demonstram a utilidade desse modelo por reproduzir as principais manifestações clínicas da periodontite observadas em humanos e poder auxiliar na investigação dos mecanismos envolvidos na lise óssea associada com essa doença.

O tratamento dos animais durante 11 dias com *Cimicifuga racemosa* reduziu ($p < 0,05$) a perda óssea alveolar observada após 11 dias de periodontite, quando comparado ao grupo

controle, ou seja, grupo de animais submetidos à indução da periodontite e que recebeu apenas o veículo (salina).

Cimicifuga racemosa é usada na medicina popular como agente analgésico e anti-inflamatório, além de aliviar os sinais/sintomas da menopausa (WOO *et al.*, 2004). Na perspectiva de demonstrar o possível mecanismo de ação de *Cimicifuga racemosa*, dados na literatura sugerem que o extrato de *Cimicifuga racemosa* inibe a atividade da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), reduzindo desta forma a geração das prostaglandinas em modelo animal (SUNG *et al.*, 2000). Neste sentido, nosso grupo já demonstrou que a inibição da COX-2 previne a perda óssea alveolar no modelo de periodontite em ratos (BEZERRA *et al.*, 2000). Ainda, recentemente demonstramos que a indução da periodontite determina um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de RNAm da COX-2 no tecido gengival. É importante ressaltar que as prostaglandinas, um dos metabólitos do ácido araquidônicos geradas a partir da ação das isoenzimas ciclo-oxigenase, estão envolvidas em várias funções nas respostas inflamatórias, sendo sugerida como um marcador da periodontite no fluido crevicular (MONCADA *et al.*, 1973; AZOUBEL *et al.*, 2007). Durante a progressão da periodontite, os níveis de prostaglandinas, particularmente da série E2, estão aumentadas nos tecidos gengivais inflamados (GERBINO *et al.*, 2007). Além disso, a regulação dos níveis de prostaglandinas da série E2 são reguladas pelos níveis de produção de COX-2 (BOTTING, 2006; GERBINO *et al.*, 2007). Considerando-se esses achados podemos sugerir que a eficácia de *Cimicifuga racemosa* no modelo de periodontite em ratas se deve provavelmente à inibição da COX-2, embora estudos adicionais ainda sejam necessários.

Ainda, para avaliar a segurança de *Cimicifuga racemosa* realizou-se dosagens séricas de alanina-aminotransferase (ALT), aspartate-aminotransferase (AST), creatinina e fosfatase alcalina total (FAt).

ALT é uma enzima encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST está presente na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas, pois em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação mitocondrial, elevando a relação AST/ALT. Outro fato associado à elevação da relação AST/ALT é que em lesões graves os valores de ALT podem declinar mais rapidamente por terem sido primeiramente lançados na corrente sanguínea, permanecendo, portanto os valores de AST por mais tempo elevados o que acaba elevando a relação (LIMA *et al.*, 2001). No presente estudo, a administração de *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não modificou a atividade de ALT e AST, quando comparado ao grupo controle.

A creatinina é produto do metabolismo do nitrogênio presente no sangue, utilizado clinicamente para avaliar a função renal. No presente estudo, a administração de *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) não modificou os valores de creatinina, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que *Cimicifuga racemosa* não afeta a função renal.

A Fosfatase Alcalina total (FAt) abrange praticamente todos os tecidos, sendo, contudo, mais abundante nos ossos, rins e no fígado. No nosso estudo, os valores de FAt dos animais submetidos as dose de 0,1; 1 ou 10 mg/kg mostraram-se normais quando comparados com o grupo controle, sugerindo assim que o tratamento com *Cimicifuga racemosa* não afeta as funções hepáticas.

CONCLUSÃO

- A administração de *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/kg) durante 11 dias a animais submetidos à indução da periodontite é eficaz, reduzindo a reabsorção óssea alveolar, representando uma opção terapêutica segura nesse modelo animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZOUBEL, M.C.F., MENEZES, A.M.A., BEZERRA ,D., ORIÁ, R.B., RIBEIRO , R.A. AND BRITO, G.A.C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 40, n.1, Jan. 2007.

BEZERRA M.M, LIMA V, ALENCAR V.B.M. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**. 71:1009-1014. 2000.

BORRELLI, F., ERNST, E. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*): a systematic review of adverse events **Am J Obstet Gynecol**. 199(5 455-66. 2008.

BOTTING, R. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to Jhon R. Vane (1927-2004), **J therm Biol** vol.31, Issues 1-2, Second International Meeting on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation. P. 208-219, 2006. ISSN 0306-4565

GERBINO, A., LEONE, A., FARINA-LIPARI, E., BUSCEMI, M., AND TORTORICI, S. Cox-2 expression in the inflamed gingival tissues: Immunohistochemistry, cytochemistry and biochemistry tests. **Res. Biol. Sci.**, v.2, p. 449-453, 2007

HEASMAN, P.A., LAUFFART, B.L., PRESHAW, P.M. Crevicular fluid prostaglandin E2 levels in periodontitis-resistant and periodontitis-susceptible adults. **J Clin Periodontol.** 25:1003-7. 1998.

HERNÁNDEZ, M., DUTZAN, N., GARCÍA-SESNICH, J., ABUSLEME, L., DEZEREGA A., SILVA N., GONZÁLEZ, F. E., VERNAL, R., SORSA, T., GAMONAL, J. Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis. **J Dent Res.** 90 (10):1164-1170, 2011

KIM, Y.S., LEE, Y.M., LEE, S.I., KIM, E.C., The anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide and cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in human periodontal ligament cells. **J Periodontol.** 80(12):2045-55; 2009.

LIMA, V., BEZERRA, M.M., MENEZES ALENCAR, V.B., VIDAL, F.D., ROCHA F.A., CASTRO BRITO, G.A., ALBUQUERQUE RIBEIRO, R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci.** 108 (2):123-9, 2000

MADIANOS, P.N., BOBETSIS, Y.A., KINANE, D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingival. **J Clin Periodontol.** 32(6):57-71. 2005.

MONCADA, S., FERREIRA, S.H., VANE, J.R. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. **Nature.** 246(5430):217-9. 1973

SOUZA, R.B., Análise da Expressão do RNAm de Ciclo- Oxigenase-2 e Hemeoxigenase-1 Durante a Progressão da Periodontite em Ratos: Efeito do Ranelato de Estrôncio. 2011. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2011

SUNG, J. K., MI, S. K. Inhibitory Effects of Cimicifugae Rhizoma Extracts on Histamine, Bradykinin and COX-2 Mediated Inflammatory Actions. **Phytother. Res.** 14, 596–600 (2000)

WOO, K. C., PARK, Y.S., JUN, D.J., LIM J.O., BAEK, W.Y., SUH, B.S., KIM, K.T. Phytoestrogen Cimicifugoside-Mediated Inhibition of Catecholamine Secretion by Blocking Nicotinic Acetylcholine Receptor in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. **J Pharmacol Exp Ther.** 309:641–649,2004

¹ Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Bolsista da CAPES. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. Jordaniafreire25@gmail.com;

² Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará-UFC *campus* Sobral. vetdebora@hotmail.com;

³Discente do Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. liviacunharios@hotmail.com;

⁴Discente do Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. samuelmateus.ufc@hotmail.com;

⁵ Co-orientador. Prof^a DR^a Heliáda Vasconcelos Chaves. . Curso de Odontologia. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. heliadachaves@yahoo.com.br;

⁶Orientador. Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto. Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- UFC *campus* Sobral. pintovicente@gmail.com;