

## **FITOMEDICAMENTO APLAUSE®( *Cimicifuga racemosa*) REDUZ A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATAS.**

Jordânia Marques de Oliveira Freire<sup>1</sup>; Débora da Silva Freitas Ribeiro<sup>2</sup>; Samuel Mateus Pereira Filho<sup>3</sup>; Mirna Marques Bezerra<sup>4</sup>; Hellíada Vasconcelos Chaves<sup>5</sup>; Vicente de Paulo Teixeira Pinto<sup>6</sup>.

### **RESUMO:**

**INTRODUÇÃO:** A periodontite é um processo inflamatório crônico que acomete os tecidos de sustentação dos dentes caracterizados por extensa reabsorção óssea alveolar. *Cimicifuga racemosa* 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:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de *Cimicifuga racemosa* na perda óssea alveolar em ratas, investigando o envolvimento de TNF- $\alpha$  e a segurança desse tratamento. **METODOLOGIA:** A periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) nos molares superiores de ratas Wistar (180-200 g). Os animais foram pesados e tratados (*per os*) diariamente, durante 11 dias, com *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1 mg/ kg). O grupo controle foi submetido à indução de periodontite e tratado (*per os*) diariamente, durante 11 dias, com o veículo (salina). Foram analisados os seguintes parâmetros: perda óssea alveolar, análise imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  e a segurança da administração de *Cimicifuga racemosa* através da dosagem de níveis séricos de ALT/ AST, creatinina e fosfatase alcalina total. **RESULTADOS:** *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1 mg/ kg) reduziu ( $p < 0,05$ ) a perda óssea alveolar ( $1,99 \pm 0,46$ ;  $1,55 \pm 0,31$  e  $1,64 \pm 0,57$ , respectivamente), em relação ao grupo controle ( $3,60 \pm 0,31$ ); *Cimicifuga racemosa* (1 mg/kg) diminuiu a imunomarcagem para TNF- $\alpha$ , quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina. Não se observou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os níveis séricos de ALT/ AST, creatinina e fosfatase alcalina total entre grupos tratados e controle. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que *Cimicifuga racemosa* possui efeito protetor na periodontite através da redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , além de representar uma opção terapêutica segura no ensaio pré-clínico de periodontite em ratas. Considerando que *Cimicifuga racemosa* é um fitomedicamento que já está disponível no mercado nacional com indicação para alívio dos sinais/sintomas da menopausa, a possibilidade de uma nova indicação terapêutica poderá representar uma redução importante no tempo necessário para o desenvolvimento de um novo fármaco.

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

## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada por infiltração de leucócitos, perda de tecido conjuntivo, reabsorção de osso alveolar e formação de bolsa periodontal, culminando com a perda do dente, sendo este último o aspecto mais crítico e danoso da doença. 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).

A etiopatogenia da periodontite é complexa e, provavelmente, multifatorial, destacando-se a presença do agente infeccioso (biofilme bacteriano) e a resposta imune- inflamatória do hospedeiro, envolvendo a geração de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , metaloproteinases de matriz (MMP) e prostaglandina E2 – PGE-2) que são responsáveis pela amplificação e manutenção da resposta inflamatória, ocasionando em última instância a destruição do osso alveolar, culminando com a perda dentária (ARAUJO *et al.*, 2007). Tais eventos produzidos pelo hospedeiro, embora representem uma resposta de proteção, são corresponsáveis pela própria destruição tecidual. Especificamente com relação às citocinas, nosso grupo de pesquisa demonstrou que TNF- $\alpha$  parece modular a resposta imune-inflamatória durante o curso evolutivo da periodontite em ratos (LIMA *et al.*, 2000). Apesar desses achados, a caracterização dos mecanismos celulares e moleculares que formam a base desse processo destrutivo, assim como seu diagnóstico e tratamento, ainda carece de maior estudo. 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* 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 do fitomedicamento APLAUSE® (*Cimicifuga racemosa*) em um ensaio pré-clínico de periodontite investigando o possível envolvimento do Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ).

## **METODOLOGIA**

Foram utilizados 60 ratos *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 *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1 mg/kg). O grupo 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 *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1 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.

A histopatologia do osso alveolar foi feita em cortes seriados das hemiarcadas com periodontite. Após fixação em formol a 10 %, as hemiarcadas foram descalcificadas em solução de EDTA (10 %) trocadas a cada 48 horas por um período de 40 dias.

A partir daí, o material foi lavado em água corrente por 24 horas e processados para inclusão em parafina. Após o processo de inclusão foram feitos cortes seriados vestibulo-linguais (5 µm) seguindo-se coloração pela hematoxilina-eosina (H & E). A análise semi-quantitativa das lâminas processadas foi feita avaliando as regiões entre os 1º e 2º molares a presença de infiltrado celular e osteoclastos, e estado de preservação do cemento e processo alveolar. A análise foi feita de acordo com os critérios histopatológicos previamente estabelecidos por Brito *et al* in Bezerra *et al.*, 2000.

Para realização de imunohistoquímica, os espécimes foram novamente submetidos a cortes de 5 µm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co®, St Luis, MO, EUA). Os cortes foram submetidos ao anticorpo TNF-α utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase.

Ademais, aos 11 dias da PE, amostras de sangue periférico foram colhidas, centrifugas e o plasma armazenado (-20<sup>0</sup> 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 *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 10 mg/kg) ( $1,99 \pm 0,46$ ;  $1,55 \pm 0,31$  e  $1,64 \pm 0,57$ , respectivamente), em relação ao grupo controle ( $3,60 \pm 0,31$ ).

Na análise histopatológica realizada aos 11 dias de periodontite na região entre os 1º e 2º molares superiores esquerdos das ratas tratadas com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) mostraram infiltrado celular inflamatório discreto, preservação parcial do processo alveolar e cemento preservado [1 (0-1)] quando comparados ao grupo controle [2(1-3)].

Os resultados da imunohistoquímica mostraram que tratamento com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) reduziu a intensidade da imunomarcagem para TNF-α quando comparado ao grupo não tratado.

Além disso, *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1 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. No entanto, o papel exato de cada um desses fatores ainda carece de maiores elucidações.

No presente estudo foi demonstrada 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). O tratamento com *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1mg/ kg *per os*), em nosso estudo, reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a perda óssea alveolar observada após 11 dias de indução da periodontite, quando comparado ao grupo controle (salina). Esses resultados podem estar relacionados com a propriedade osteoprotetora presente no extrato de *Cimicifuga racemosa*, conforme demonstrado no estudo de Viereck e colaboradores (2005<sup>a</sup>). Outros estudos demonstram que o extrato isopropanólico de *Cimicifuga racemosa* reduz a perda óssea e melhora a qualidade do osso (NISSLEIN & FREUDENSTEIN, 2003).

Nossos resultados da análise histopatológica das hemiarquadas do grupo controle (salina) mostraram a presença de intenso infiltrado celular inflamatório, destruição total do processo alveolar e do cemento, achados que conferem com os estudos de Lima e colaboradores (2000) e de Leitão e colaboradores (2004). Os animais tratados com *Cimicifuga racemosa* na dose de 1mg/kg revelaram significativa redução do número de osteoclastos, preservação do processo alveolar e cemento, e uma redução do infiltrado celular inflamatório, quando comparados aos animais do grupo controle (salina). Estes resultados mais uma vez corroboram com estudos da *Cimicifuga racemosa* que registram sua capacidade de inibição da osteoclastogênese, das colagenases e ainda redução de processos inflamatórios (KUSANO *et al.*, 2001; NISSLEIN & FREUDENSTEIN, 2003; VIERECK *et al.*, 2005; QIU *et al.*, 2007).

No presente estudo, com a finalidade de avaliar o envolvimento de TNF- $\alpha$  no modelo de periodontite em ratas, foi realizada imunohistoquímica em cortes de maxila. A análise dos resultados revelou aos 11 dias de periodontite um grande número de células imunomarcadas para TNF- $\alpha$ , o que está de acordo com a literatura corrente (LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2005).

Portanto, os resultados do presente estudo ratificam o envolvimento do TNF- $\alpha$  na fisiopatologia da periodontite. Com base nesses resultados, no presente estudo avaliou-se o possível efeito da *Cimicifuga racemosa* sobre a produção de TNF- $\alpha$ . O tratamento com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) reduziu a marcação para TNF- $\alpha$  nos cortes de maxilas, o que está de acordo com o trabalho de Schmid e colaboradores (2009), que obtiveram diminuição da concentração de TNF- $\alpha$  em sangue humano após administração de compostos presentes no extrato de *Cimicifuga racemosa*.

Uma vez demonstrada a eficácia de *Cimicifuga racemosa* na periodontite experimental em ratas, buscou-se avaliar sua segurança no modelo. Estudos clínicos e relatos espontâneos sugerem que os eventos adversos associados com *Cimicifuga racemosa* são raros, geralmente leves e reversíveis (LUDE *et al.*, 2007). A avaliação da função hepática feita pela determinação das enzimas AST e ALT, evidenciando que não houve alterações hepáticas oriundas do uso de *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1mg/kg) durante os 11 dias de tratamento mostra uma baixa ordem de toxicidade hepática do composto. Também foram determinados os níveis séricos de creatinina, usados para avaliação da função renal e fosfatase alcalina total que abrange praticamente todos os tecidos, sendo, contudo, mais abundante nos ossos, rins e no fígado. Os dados do estudo também sugerem que o tratamento com *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1mg/kg) não afetou estes parâmetros. Além disso, a curva ponderal dos animais tratados não foi diferente do grupo não submetido à ligadura, mantendo-se aqueles em curva crescente até o 11º dia de acompanhamento.

## CONCLUSÃO

- A administração de *Cimicifuga racemosa* (0,01; 0,1 ou 1 mg/kg) durante 11 dias a ratas submetidas à indução da periodontite é eficaz, reduzindo a reabsorção óssea alveolar através da diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , representando uma opção terapêutica segura nesse modelo animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO M. G.; SUKEKAVA F. Epidemiologia da Doença Periodontal na América Latina. R. **Periodontia**, v. 17, 2007.

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.

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 .

KUSANO, A.; SEYAMA, Y.; NAGAI, M.; SHIBANO, M.; KUSANO G. Effects of Fukinolic Acid and Cimicifugic Acids from *Cimicifuga* Species on Collagenolytic Activity. **Biol. Pharm. Bull.** v. 24, n. 10, p. 1198-1201, 2001.

LEITÃO, R. F. C.; ROCHA, F. A. C.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontal.** v. 75, p. 1227-1232, 2004.

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.

NISSLEIN, T.; FREUDENSTEIN, J. Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism.** v. 21, n. 6, p. 370-6, 2003.

QIU, S. X. A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNF $\alpha$  signaling pathways. **Chemical Biology.** v. 14, n. 7, p. 860-9, 2007.

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

VIERECK, V. Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. **Journal of Bone Mineralization Research.** v. 20, n. 11, p. 2036-43, 2005.

<sup>1</sup> Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Bolsista da Capes. Universidade Federal do Ceará-UFC - *Campus* Sobral. [Jordaniafreire25@gmail.com](mailto:Jordaniafreire25@gmail.com);

<sup>2</sup> Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará – UFC - *Campus* Sobral. [vetdeborahotmail.com](mailto:vetdeborahotmail.com);

<sup>3</sup> Discente do Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará - UFC *Campus* Sobral. [samuelmateus.ufc@hotmail.com](mailto:samuelmateus.ufc@hotmail.com)

<sup>4</sup> Docente do Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará - UFC - *Campus* Sobral. [mirnabrayner@gmail.com](mailto:mirnabrayner@gmail.com);

<sup>5</sup> Co-orientador. Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Hellíada Vasconcelos Chaves. Curso de Odontologia. Universidade Federal do Ceará- UFC - *Campus* Sobral. [helliadachaves@yahoo.com.br](mailto:helliadachaves@yahoo.com.br);

<sup>6</sup> Orientador. Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto. Curso de Medicina. Universidade Federal do Ceará- UFC - *Campus* Sobral. [pintovicente@gmail.com](mailto:pintovicente@gmail.com);