



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JORDÂNIA MARQUES DE OLIVEIRA

EFICÁCIA E SEGURANÇA DO FITOMEDICAMENTO APLAUSE® (*Cimicifuga racemosa*) EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA (TNF- α)

SOBRAL-CE

2013

JORDÂNIA MARQUES DE OLIVEIRA

EFICÁCIA E SEGURANÇA DO FITOMEDICAMENTO APLAUSE® (*Cimicifuga racemosa*) EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL- ALFA (TNF- α)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Vicente de Paulo Teixeira Pinto
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

SOBRAL-CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Curso de Medicina de Sobral

O45e Oliveira, Jordânia Marques de.

Eficácia e segurança do fitomedicamento aplause® (*cimicifuga racemosa*) em ensaio pré-clínico de periodontite: análise do envolvimento do fator de necrose tumoral-alfa (tnf- α) / Jordânia Marques de Oliveira. – 2013.

70 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientação: Prof. Drº. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.

Coorientação: Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves.

1.Reabsorção óssea. 2. Osteoclastos. I. Título.

CDD 660.6

JORDÂNA MARQUES DE OLIVEIRA

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO FITOMEDICAMENTO APLAUSE®
(*Cimicifuga racemosa*) EM ENSAIO PRÉ-CLÍNICO DE PERIODONTITE:
ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL-
ALFA (TNF- α)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

APROVADE EM: 28/02/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^º. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof^ª. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) - - *Campus* Sobral

Prof^ª. Dra. Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

Aos meus pais e meu irmão, por sempre acreditarem em mim, Ao meu esposo pelo apoio e dedicação diários e ao meu filho, mesmo tão pequeno já me ensinado o verdadeiro sentido da vida. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre me conduzir pelos melhores caminhos.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, por toda acessibilidade, dedicação e orientações bem sucedidas.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves por todo empenho na execução dos experimentos, por toda atenção pra que tudo saísse da melhor forma possível e por todo o conhecimento repassado durante os anos no laboratório.

À Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra, pelo empenho em ensinar as coisas da melhor forma possível, pela acessibilidade em todos os momentos, pela dedicação ao trabalho e principalmente por ser um ser humano de alma iluminada, que passa tranquilidade aos que estão ao seu redor, a Senhora não tem ideia de como isso é importante para que o trabalho seja efetuado com êxito, muito obrigada por toda amizade e confiança depositado desde o tempo de iniciação científica.

Ao Prof^o Dr^o Alfredo por todas as observações feitas para que meu trabalho saísse o melhor possível e por todos os momentos lúdicos proporcionados ao longo dos anos no Laboratório

À Prof^a.Dr^a Lissiana Magna, pelo apoio, dedicação e por todo conhecimento repassado.

À Prof^a. Dr^a Karuza Maria Alves Pereira pela contribuição nas análises histológicas.

Aos alunos de Iniciação Científica Natacha Arriaga, Jonas Cavalcante, Jonatas Cavalcante, Camila, Salmito, Anita, Mateus, Salmito por todo empenho.

Aos estimados Samuel e Lívia sem vocês com certeza não tinha conseguido realizar todos os meus experimentos no prazo, vocês foram peças fundamentais durante essa trajetória de estudos e além de tudo agradeço pela amizade que se consolidou. Muito grata por tudo.

As minhas amigas mestrandas Débora, Kátia, Nicolly, por compartilharmos momentos importantes dentro do laboratório e por toda ajuda.

Ao técnico de laboratório Junior Lima por toda dedicação nos cortes histológicos e principalmente pela amizade que foi construída ao logo dos dias árduos de trabalho dentro do laboratório de Patologia.

Ao Laboratório de Genética Molecular do Núcleo de Biotecnologia de Sobral- NUBIS por todo suporte fornecido quando necessário aos experimentos de Biologia Molecular, em especial ao Professor Rodrigo Maranguape por toda acessibilidade.

À técnica de Biologia Molecular, Auxiliadora por todo empenho e ajuda nos meus experimentos de Biologia Molecular.

Ao Msc Ricardo por toda disponibilidade e acessibilidade quando precisei. Muito obrigada.

Aos professores do programa de pós- graduação em Biotecnologia, André, José Roberto, Benildo, Geison, Ronaldo, Edson, por todo conhecimento repassado.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, Gady, Diná, Seu Almino, Alcione, Seu Araújo, Seu Antônio, Seu Robério, Aline, Carlos, Edílida, por todo empenho e dedicação em suas atividades.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha Mãe, Maria das Graças de Oliveira por ser a pessoa que mais acreditou e acredita em mim, por passar todos os momentos ao meu lado sejam momentos bons e até aqueles mais difíceis, por ter batalhado para que eu tivesse um futuro promissor, por abdicar de seus sonhos pelos meus, sou eternamente grata por tanto amor, acho que nunca vou poder retribuir por tudo que a senhora já fez e faz por mim, Muito Obrigada, Amo você.

Ao meu Pai, Francisco Marques de Oliveira que mesmo pelo seu jeito reservado nunca deixou de acreditar e me apoiar e me incentivar, não tenho como agradecer todos os gestos de carinho, de trabalho e dedicação a nossa família para que tudo corresse da melhor forma possível. Sou grata a Deus por você ser meu Pai e Orgulho disso, exemplo de vida. Amo você.

Ao meu Irmão, Jorge Luís Marques de Oliveira por ser o irmão mais lindo do mundo, pela sua admiração por mim, por todo amor que você passa com seu olhar isso não tem preço, são pequenos gestos que realmente sentimos o amor das pessoas. Amo você.

As minhas tias Ana Maria e Neuma por serem minhas outras duas mães, por todo apoio desde a infância até os dias de hoje, pela amizade, confidências e muito amor que as duas sempre me repassaram, amo muito as duas sempre.

Ao meu Esposo, Clayrtiano Alves Freire por toda dedicação, por Sempre dizer que tudo vai dar certo e que Sempre vai estar do meu lado me apoiando, Muito obrigada por tanto amor, sou mais feliz por você fazer parte da minha vida. Amo você.

Ao meu Filho, João Arthur por me fazer uma mulher Feliz e realizada. E por me apresentar ao verdadeiro Amor e ao verdadeiro sentido da Vida. Amo você minha Vida.

Aos meus Avós paternos e maternos por me proporcionarem tanto amor.

A minha amiga- irmã Moêmia Portela, por toda confiança, amizade sincera, pelo companheirismo e por compartilhar os momentos marcantes da minha vida.

A minha amiga Juliane Passos por todos os conselhos e ajuda de sempre, por sempre me mostrar o lado bom dos acontecimentos e dizer que o melhor está por vir.

A minha amiga Danielle Val por sempre dizer que tudo vai dar certo, obrigada por toda ajuda, disponibilidade, confiança e apoio dentro e fora do laboratório.

A minha amiga Ângela por todos os conselhos, momentos de desabafo, por abrir as portas de sua casa para dias intensos de estudos, que valeram a pena, e por toda amizade e confiança.

Ao casal Amélia e Jackson pela disposição para ajudar e aconselhar. Muito obrigada.

Aos meus amigos Rony Barroso e Anderson Weiny por todos os momentos felizes proporcionados ao longo de nossa amizade.

A Auricélia por toda dedicação ao meu Filho e a minha Casa.

Aos meus colegas de mestrado, Regislane, Mariana, Bruno, Rafaelle, Érica, Alexandre, Denyse por todos os momentos compartilhados durante nossos longos dias de estudo e por toda experiência compartilhada.

RESUMO

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. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de Cr na perda óssea alveolar em ratas, investigando o envolvimento de citocinas (TNF- α), e a segurança desse tratamento. A periodontite (PE) 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* (0,1; 1 ou 10 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- α , dosagem de citocina e avaliação da segurança da *Cimicifuga racemosa*. *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 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 marcação da citocina pró-inflamatória TNF- α quando comparados 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. Os animais tratados com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) não tiveram alterações na mucosa gástrica quando comparados aos animais tratados apenas com salina. Nossos resultados sugerem que *Cimicifuga racemosa* possui efeito protetor na periodontite através da inibição de citocinas (TNF- α), 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 no mercado brasileiro com indicação para alívio dos sinais/sintomas da menopausa, a possibilidade de uma nova indicação terapêutica para um fitomedicamento já disponível nas prateleiras poderá determinar uma considerável redução no tempo necessário para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Palavras- chave: *Cimicifuga racemosa*, Periodontite, Reabsorção Óssea.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory process that affects the supporting tissues of teeth characterized by extensive alveolar bone resorption. *Cimicifuga racemosa* is a herbaceous plant belonging to the family Ranunculaceae, native to Canada and the Atlantic coast of the United States, and is commonly used in traditional medicine as an analgesic, anti-inflammatory and for the treatment of menopause symptom. This study aimed to evaluate the effectiveness of Cr on alveolar bone loss in rats, investigating the involvement of cytokines (TNF- α), and the safety of this treatment. Periodontitis (PE) was induced by placing a nylon thread (3.0) in the upper molars of Wistar rats (180-200 g). Animals were weighed and treated (per os) daily for 11 days with *Cimicifuga racemosa* (0.1, 1 or 10 mg / kg). The control group underwent induction of periodontitis and was treated (per os) daily for 11 days with vehicle (saline). We analyzed the following parameters: alveolar bone loss, immunohistochemical analysis for TNF- α , cytokine dosage and safety assessment of *Cimicifuga racemosa*. *Cimicifuga racemosa* (0.1, 1 or 10 mg / kg) reduced ($p < 0.05$) bone loss (1.99 ± 0.46 , 1.55 ± 0.31 and 1.64 ± 0.57 respectively) compared to the control group (3.60 ± 0.31); *Cimicifuga racemosa* (1 mg / kg) decreased the marking of the proinflammatory cytokine TNF- α when compared to the group that received only saline. There was no difference ($p > 0.05$) between serum ALT / AST, creatinine and total alkaline phosphatase between treated and control groups. The animals treated with *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) had no changes in the gastric mucosa when compared to animals treated with saline. Our results suggest that *Cimicifuga racemosa* has a protective effect on periodontitis by inhibiting cytokine (TNF- α), and represent a safe therapeutic option in preclinical testing of periodontitis in rats. Considering that *Cimicifuga racemosa* is a phytomedication already in the market indicated for relief of the signs / symptoms of menopause, the possibility of a new therapeutic indication for phytomedication now available on the shelves may determine a considerable reduction in the time required to develop new drugs.

KEY WORDS: *Cimicifuga racemosa*, Periodontitis, Bone Resorption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Representação esquemática de um processo de periodontite	20
Figura 02: Representação esquemática da ação do sistema RANK/RANKL/OPG.	26
Figura 03: Ilustração de <i>Cimicifuga racemosa</i>	30
Figura 04: Estrutura dos triterpenos de <i>Cimicifuga racemosa</i>	32
Figura 05: Esquema ilustrativo da análise da perda óssea alveolar após indução da periodontite	36
Figura 06: Efeito de <i>Cimicifuga racemosa</i> sobre a perda óssea alveolar em ratas submetidas à indução de periodontite	43
Figura 07: Fotografia ilustrativa da maxila de ratas (face vestibular) submetidas à indução da periodontite e tratados com <i>Cimicifuga racemosa</i>	44
Figura 08: Microfotografia da maxila de ratas 11 dias após indução da periodontite e tratados com <i>Cimicifuga racemosa</i> .	46
Figura 09: Efeito do tratamento com <i>Cimicifuga racemosa</i> (1mg/kg) sobre a análise imunohistoquímica para o Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α) na maxila de animais submetidos à indução da periodontite.	48
Figura 10: Efeito da <i>Cimicifuga racemosa</i> (1mg/kg) sobre a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em gengivas de ratas submetidas à periodontite.	49
Figura 11: Efeito do tratamento com <i>Cimicifuga racemosa</i> sobre a curva ponderal de ratas submetidas à indução da periodontite.	51
Figura 12: Fotomicrografias da mucosa gástrica de animais tratados com <i>Cimicifuga racemosa</i> e submetidos à indução da periodontite.	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Escores e critérios histopatológicos para análise da Periodontite. 37
- Tabela 02:** Efeito do tratamento com *Cimicifuga racemosa* na análise 47
histopatológica da maxila de ratas submetidas à periodontite.
- Tabela 03:** Avaliação do tratamento com *Cimicifuga racemosa* sobre 52
parâmetros bioquímicos em ratas submetidas à indução de periodontite.
- Tabela 04:** Análise do efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre a mucosa gástrica 54
de ratas submetidas à periodontite.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Transaminase Glutâmico Pirúvica

AST- Transaminase Glutâmico Oxalacítica

AkT- Proteína quinase específica de serina

Cr- *Cimicifuga racemosa*

CO- Monóxido de carbono

COX-1- Ciclo- oxigenase tipo 1

COX-2- Ciclo- oxigenase tipo 2

COX-3- Ciclo- oxigenase tipo 3

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra- acético

g- Grama

Kg- Quilograma

kDA- Quilodalton

H⁺ - Íons de hidrogênio

IL-1- Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL- 6- Interleucina 6

IL- 17- Interleucina 17

LPS- Lopopolissacarídios

Mm²- Milímetro quadrado

MMP- Metaloproteinases de matriz

Nrf-2- Fator nuclear eritróide 2

OPG- Osteoprotegerina

PI3K- Proteína quinase específica de serina

PGE2- Prostaglandina da Série E2

RANKL- Receptor ativador do fator nuclear Kappa- beta

RANKL- Proteína ligante de RANK

TNF- Fator de necrose tumoral

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2.JUSTIFICATIVA	18
3.REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1.PERIODONTITE	19
3.2.PERIODONTITE EXPERIMENTAL	21
3.3.MECANISMOS CELULARES DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	23
3.4.REMODELAÇÃO ÓSSEA DURANTE A PERIODONTITE	25
3.5.CITOCINAS NA PERIODONTITE	27
3.6.USO DE PRODUTOS NATURAIS PELAS COMUNIDADES: OPÇÃO TERAPÊUTICA NA PERIODONTITE	28
4.OBJETIVO GERAL	33
4.1.OBJETIVO ESPECÍFICO	33
5.METODOLOGIA	33
5.1.ANIMAIS	33
5.2.DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS	34
5.3. OBTENÇÃO DA <i>Cimicifuga racemosa</i>	34
5.4.MODELO EXPERIMENTAL	35
5.5.PARÂMETROS AVALIADOS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL	35
5.5.1.PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	35
5.5.2.ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	36
5.6.IMUNOHISTOQUÍMICA	37

5.7. DOSAGEM DE CITOCINA	38
5.8. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA	39
5.9. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS	39
5.10. ANÁLISE DA MUCOSA GÁSTRICA	41
5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6. RESULTADOS	42
6.1. EFICÁCIA DE <i>CIMICIFUGA RACEMOSA</i> SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR NO MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS	42
6.2. EFEITO DE <i>CIMICIFUGA RACEMOSA</i> SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS OBSERVADAS NO MODELO DE PERIODONTITE EM RATAS	45
6.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM <i>CIMICIFUGA RACEMOSA</i> SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO PARA TNF- α	45
6.4. EFEITO DE <i>CIMICIFUGA RACEMOSA</i> SOBRE A PRODUÇÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- A) NAS GENGIVAS DE RATAS SUBMETIDAS À PERIODONTITE.	49
6.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS	50
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1. 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 (LIMA *et al.*, 2008)

Estudos epidemiológicos, embora escassos, demonstram uma alta prevalência da periodontite em todo mundo, podendo ser observada em todas as faixas etárias, embora exista uma correlação positiva entre idade e gravidade da doença. Portanto, representa um grave problema de saúde pública, sendo a principal causa de perda de dentes em adultos (BARBATO *et al.*, 2007).

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- α , IL-6, IL-1 β , 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 (ARAÚJO *et al.*, 2007). Tais eventos produzidos pelo hospedeiro, embora representem uma resposta de proteção, são co-responsáveis pela própria destruição tecidual. Especificamente com relação às citocinas, nosso grupo de pesquisa demonstrou que TNF- α 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.

A identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fitofármacos é necessária e está se tornando uma alternativa acessível aos povos do mundo, tornando-se adequada para as necessidades locais de centenas de países no atendimento primário à saúde, refletindo em uma melhor qualidade de vida das populações (ELDIN & DUNFORD, 2001).

Cimicifuga racemosa pertence à família das Ranunculaceae e é nativa do leste da América do Norte e o seu extrato é produzido a partir de suas raízes. É também conhecida por outros nomes como, *Black Cohosh*; *Actaea racemosa*; *cimicífuga Serpentaria*; *Botrophys Racemosa*; *Black Snakeroot* e *C. Racemosa Nuttall* (SCHAFFNER *et al.*, 2005; BLOHMER *et al.*, 2006). *Cimicifuga racemosa* foi usada pelos povos antigos da Coreia e das antigas

colônias da América do Norte como anti-inflamatório, no combate a febre, como analgésico e para o tratamento das cólicas menstruais e sintomas da menopausa (BOLLE *et al.*, 2007).

Um possível mecanismo de ação sugerido para essa planta envolve modulação do metabolismo ósseo, produzindo um balanço positivo no processo de neoformação/reabsorção óssea. De fato, ensaios clínicos envolvendo mulheres pós-menopausa o extrato de *Cimiciguga racemosa* estimulou a atividade dos osteoblastos, inibindo as células responsáveis pela reabsorção óssea (WUTTKE *et al.*, 2006).

A despeito do uso frequente pelas comunidades de produtos naturais, o uso dessa terapêutica na condução da periodontite ainda carece de estudos pré-clínicos e clínicos que possam ratificar a eficácia e comprovar seus benefícios através de estudos que abordem a fisiopatologia da periodontite. Neste sentido, este estudo se propõe a investigar a eficácia e segurança *Cimiciguga racemosa* em um modelo de periodontite em ratas.

2. JUSTIFICATIVA

A periodontite é um processo inflamatório crônico, que acomete o osso alveolar, sendo uma doença extremamente incapacitante por ocasionar mobilidade e perda dentária. É a principal responsável por perda de dentes em adultos, afetando diretamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por essa patologia, desequilibrando o sistema estomatognático como mastigação, deglutição, podendo ainda comprometer a fala, assim como a estética do sorriso, consequentemente afetando a autoestima (ARAUJO *et al.*, 2007), o que torna, portanto um grave problema de saúde pública.

O estudo da periodontite por meio de modelos animais que mimetizem os principais achados clínicos desse processo nosológico poderá contribuir para o esclarecimento do papel da resposta imune-inflamatória do hospedeiro na evolução dessa doença, fomentando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o manejo de uma doença de etiopatogenia complexa e multifatorial, representando um lenitivo para os pacientes.

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. A identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas de saúde pública, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos

seguros e de baixo custo, refletindo em uma melhor qualidade de vida da população (VAL, 2012).

Neste sentido, o estudo da possível eficácia e segurança do fitofármaco *Cimicifuga racemosa* na periodontite em ratas poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica para o manejo da periodontite. Além disso, a possibilidade de utilizar uma droga que já está no mercado poderá reduzir sobremaneira o grande intervalo de tempo inerente aos ensaios pré-clínicos e clínicos para o desenvolvimento de um novo fármaco, além de sugerir uma nova indicação terapêutica para um fármaco que já demonstrou ser eficaz e seguro. Investigamos ainda a segurança de *Cimicifuga racemosa* sobre o trato gastrointestinal na perspectiva de avaliar a relação custo-benefício dessa substância quando comparada aos anti-inflamatórios não esteroidais, que geralmente representam a primeira opção de prescrição pelos cirurgiões-dentistas como droga de alívio sintomático da periodontite, mas que são associados com a ocorrência de distúrbios gastrointestinais, incluindo úlcera péptica e duodenal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PERIODONTITE

O periodonto forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre alterações com a idade, além de estar sujeito a mudanças morfológicas determinadas por condições fisiológicas (como gravidez) e/ou patológicas (gengivite, periodontite) (LINDHE *et al.*, 2010). Os tecidos periodontais incluem gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar (Figura 01), tendo como funções inserir as unidades dentárias no tecido ósseo dos maxilares, bem como manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral.

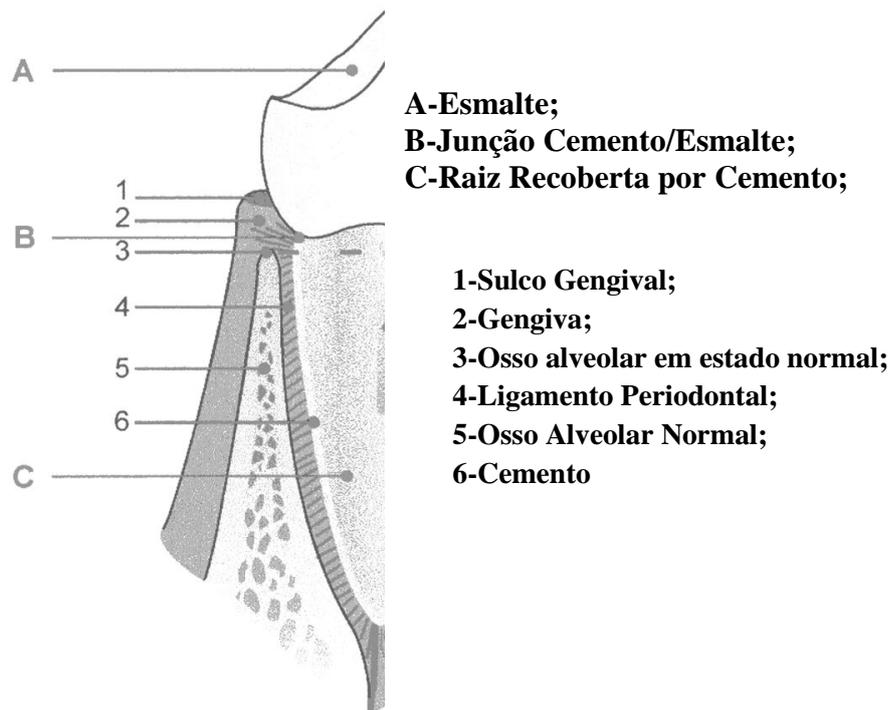


Figura 01: Representação esquemática de um processo de periodontite explorado através de uma sonda para determinação da perda de inserção óssea. Fonte: Adaptada LOURO *et al.*, 2001

As doenças periodontais apresentam elevada prevalência na população brasileira e podem ser subdivididas em reversíveis e não reversíveis (ARAÚJO *et al.*, 2007). Na categoria reversível inclui-se gengivite que é uma reação inflamatória da gengiva marginal ocasionada por biofilme bacteriano. A gengivite é caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular aumentada e influxo de monócitos- macrófagos, leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico para o tecido conjuntivo periodontal (KINNEY *et al.*, 2007).

A categoria não reversível inclui a periodontite que é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes e por reabsorção óssea, infiltrado leucocitário e formação de bolsa periodontal. Geralmente a periodontite progride em ritmo lento e constante com episódios de agudização (ALBANDAR, 1990; SOCRANSKY *et al.*, 1984).

A periodontite representa uma das principais causas de perda de dentes em adultos (AGRAWAL *et al.*, 2012). De fato, em estágios mais avançados, a periodontite ocasiona o dano irreversível dos tecidos de suporte dos dentes, resultando no endentulismo, desequilibrando o sistema estomatognático, comprometendo a mastigação, a deglutição, a

fala, assim como a estética do sorriso, reduzindo a autoestima dos pacientes, afetando sua qualidade de vida (PAGE & SCHROEDER, 1990; ARAUJO *et al.*, 2007).

Além de afetar os tecidos periodontais dados da literatura sugerem que a periodontite pode estar relacionada com doenças cardiovasculares (ASHRAF *et al.*, 2012), diabetes (HAN *et al.*, 2012), podendo ser considerada fator de risco para pré-eclâmpsia (SILVA *et al.*, 2012) e ainda pode ser a causa da indução de partos prematuros e de bebês com baixo peso ao nascer (OFFENBACHER, 1996).

A etiopatogenia da periodontite é complexa e, provavelmente, multifatorial, destacando-se a presença do agente infeccioso (biofilme bacteriano) e a respostas inflamatórias e imune do hospedeiro, determinando a geração de mediadores inflamatórios, tais como as prostaglandinas – produto da via das ciclo-oxigenases (COX) e citocinas que são responsáveis pela amplificação e manutenção da resposta inflamatória, ocasionando em última instância a destruição do osso alveolar, culminando com a perda dentária (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004). Alguns fatores como genética e tabagismo podem ocasionar um risco maior do que as bactérias, resultando numa gravidade dos resultados clínicos. Contudo, a patogênese da periodontite consiste em uma sequência de eventos imuno-inflamatórios ainda não completamente elucidados (SOUZA, 2011). Esses eventos mesmo sendo de proteção do organismo acabam sendo responsáveis pela própria destruição dos tecidos periodontais (PAGE e KORNMAN, 1997).

3. 2. PERIODONTITE EXPERIMENTAL

Uma maneira eficaz de se estudar as alterações clínicas e histopatológicas observadas na periodontite é através do desenvolvimento de modelos animais que reproduzam as principais manifestações observadas em humanos com essa doença.

As espécies mais utilizadas são primatas, cães, ratos, coelhos, porcos e hamsters (MADDEN *et al.*, 1994; SELVIG, 1994). Contudo, é válido enfatizar que, independente da espécie usada, sempre os protocolos experimentais devem ser conduzidos assegurando-se os princípios éticos da experimentação envolvendo animais não humanos e as boas práticas em laboratório.

Vários modelos de periodontite experimental já foram desenvolvidos. Alguns autores induziram a periodontite em hamsters através do uso de uma dieta (dieta 2000 Keyes) que promovia o acúmulo de placa bacteriana e subsequente alterações periodontais (KEYES &

JORDAN, 1964). Mais adiante, foi demonstrado, em ratos e macacos, que a colocação de fios de seda na cervical dos dentes associados à gengiva saudável ou inflamada resultava em destruição periodontal (ROVIN *et al.*, 1966; KENNEDY & POLSON, 1973; SALLAY *et al.*, 1982). Foi também desenvolvido um modelo de periodontite em cães que consistia na colocação de fios de seda (nº 3) na cervical dos pré-molares e molares mandibulares (SCHROEDER & LINDHE, 1975). Esses autores demonstraram que a indução da periodontite nesses animais foi associada ao desenvolvimento de exsudato gengival purulento, aumento do espaço interdentário, rápida perda do osso alveolar e crescente mobilidade dentária. Nesses modelos, a reabsorção do processo alveolar foi observada histologicamente a partir do 3º dia após indução da periodontite. Desta forma, os achados observados nesses modelos animais recapitulam as principais manifestações clínicas da periodontite em humanos.

De todos esses animais o mais utilizado é o rato (*Rattus norvegicus albinus*) (ROBINSON *et al.*, 1991), pois a anatomia da junção dentogengival da região dos seus molares é a mais semelhante com a descrita no homem. A doença nessa espécie animal pode ser induzida de diversas formas, tais como, por meio de manipulação dietética (GARANT *et al.*, 1979; KLAUSEN, 1991; ROBINSON *et al.*, 1991; SALLAY *et al.*, 1984) , através da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (FIEHN *et al.*, 1992; ROBINSON *et al.*, 1991) e, ainda, por meio da colocação de ligaduras na região cervical dos molares superiores (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; ALENCAR *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2002)

Os achados clínicos e microscópicos da periodontite induzida em ratos são semelhantes àqueles observados no homem com sangramento gengival e, microscopicamente, o epitélio juncional sofre alterações graduais como formação de cristas epiteliais, ulceração e migração apical. Observa-se ainda, no tecido conjuntivo subjacente, infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos, bem como destruição de fibras colágenas e atividade osteoclástica aumentada (YOSHIE *et al* 1987; ROBINSON *et al.*, 1991).

Uma vez definido o método de indução da periodontite experimental, uma série de estudos pode ser realizada com relação à sua patogênese, evolução e terapêutica. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos utilizando um modelo experimental em ratos em que periodontite pode ser induzida, reproduzida e facilmente mensurável por colocação de ligadura no segundo molar superior esquerdo (BEZERRAB *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al*, 2004). Este modelo é altamente reprodutível onde a ligadura atua

como um trauma mecânico sobre a área dento-gengival reduzindo assim a integridade do tecido e permitindo que haja interação entre biofilme bacteriano e hospedeiro, induzindo a perda óssea alveolar que tem início 3 dias após a indução, atingindo um máximo entre os dias 7 e 11, e declinando no dia 14. Entretanto, embora nesse modelo a perda óssea apresente uma redução aos 14 dias, o dano tissular é irreversível, comprometendo a fisiologia do sistema estomatognático (LIMA *et al.*, 2000).

Portanto, o modelo de periodontite desenvolvido pelo nosso grupo representa uma importante estratégia para o estudo da fisiopatologia da reabsorção óssea *in vivo*, uma vez que é possível quantificar a perda óssea diretamente, permitindo avaliar os efeitos de ferramentas farmacológicas que possam interferir nesse processo destrutivo, contribuindo para a compreensão dos fenômenos inflamatórios envolvidos no mecanismo de lise óssea e desenvolvimento de opções terapêuticas que possam alterar o curso evolutivo desta doença óssea inflamatória. Assim, seja como corpo estranho ou como fator retentivo à microbiota oral, a presença do fio incita uma resposta local que muito se assemelha à periodontite humana (BEZERRA *et al.*, 2000).

3. 3. MECANISMOS CELULARES DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

O osso é um tecido composto por células da matriz extracelular que pode ser subdividida em parte inorgânica e orgânica. A matriz orgânica é constituída principalmente por 95% de colágeno tipo I e a parte inorgânica contém predominantemente cálcio e fósforo, que aparece na forma de cristais de hidroxiapatita depositado na matriz colagenosa (FENG, 2009; SING *et al.*, 2012).

Apesar de seu aspeto aparentemente inerte, os ossos são estruturas plásticas altamente dinâmicas que, durante toda a vida do organismo, estão em permanente processo de remodelação (FENG, 2009; SING *et al.*, 2012). De fato, o tecido ósseo passa por processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, onde participam células distintas como os osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos que estão relacionadas à formação e manutenção e os osteoclastos que participam da reabsorção (ANDIA *et al.*, 2006).

Os osteoblastos são células mononucleadas de origem mesenquimal que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. São ligeiramente alongadas formando uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que

está sendo formada. São as células responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso e sua mineralização (MACKIE, 2003; CERRI, 2005; TAT *et al.*, 2009).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas tendo origem hematopoiética e se diferenciam a partir de precursores de monócitos/ macrófagos, que chegam ao local da reabsorção via corrente sanguínea (TEITELBAUM, 2000; VAN'T HOF; RALSTON, 2001; LINS *et al.*, 2007; TAT *et al.*, 2009). Possuem características únicas tais como: múltiplos núcleos (mais de 50) rodeados por aparelho de Golgi bem desenvolvido, mitocôndrias e uma grande número de vacúolos e lisossomos (HALL, CHAMBERS, 1996; TEITELBAUM, 2000; VÄÄNÄNEN *et al.*, 2000). Os osteoclastos possuem bordas franzidas e zonas de vedação. A zona de vedação é definida como uma banda de espessura de actina que auxilia na fixação dos osteoclastos à superfície óssea denominada de lacunas de *Howship* que caracterizam regiões de reabsorção óssea. O local abaixo das bordas franzidas é ácido favorecendo assim a dissolução dos minerais do osso (BLAIR *et al.*, 1989; NAKAMURA *et al.*, 1994; DESTAING *et al.*, 2003; LUXENBURG *et al.*, 2007).

As membranas franzidas possuem vacúolos denominados H⁺-ATPase que são responsáveis pelo transporte de prótons nas lacunas de *Howship*. Além dos vacúolos, as enzimas lisossômicas também são emitidas por estas membranas, ocasionando a degradação da matriz orgânica do osso. A proteinase de cisteína Catepsina K e a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) também estão envolvidas na degradação do colágeno tipo I e são liberadas a partir da membrana franzida. (REPONEN *et al.*, 1994; TEZUKA *et al.*, 1994;)

Em condições fisiológicas, a formação e a reabsorção óssea são fenômenos acoplados e dependentes. Esse equilíbrio promove a homeostase óssea assegurando a manutenção da integridade estrutural e do metabolismo do cálcio (COCHRAN, 2008).

A tríade molecular composta por RANK (Receptor Ativador do Fator de Transcrição NF-κB), seu ligante RANKL e Osteoprotegerina (OPG), representa um sistema chave para o controle da diferenciação e da função dos osteoclastos. O RANKL é produzido pelos osteoblastos, tanto na forma solúvel como na forma de membrana; seu receptor RANK é expresso na superfície de células pré-osteoclásticas. A interação entre RANK-RANKL induz a diferenciação e a formação de osteoclastos maduros multinucleados (osteoclastogênese), estimulando, conseqüentemente, a perda óssea. OPG também é produzida pelos osteoclastos e atua como receptor solúvel para RANKL, exercendo um efeito inibitório no processo de diferenciação dos pré-osteoclastos. OPG, através da ligação com RANKL, inibe a ligação

RANK-RANKL, prevenindo a ativação de RANK e a consequente osteoclastogênese, resultando na inibição da reabsorção óssea. Assim, RANKL pode ser descrito como sendo pro-reabsortivo e OPG como sendo um agente anti-reabsortivo (BOYLE *et al.*, 2003; TAT *et al.*, 2009). (Figura 02)

3.4. REMODELAÇÃO ÓSSEA DURANTE A PERIODONTITE

A remodelação óssea ocorre em situações fisiológicas, como forças oclusais, erupção dentária, intervenções clínicas e em condições patológicas como a periodontite (LERNER, 2004; BELIBASAKIS, BOSTANCI, 2012). Ainda, em condições fisiológicas, as células do mesênquima do periodonto e principalmente os osteoblastos expressam RANKL (KAJIYA *et al.* 2010). Já OPG é continuamente produzida por fibroblastos residentes de tecido conjuntivo (KOBAYASHI-SAKAMOTO *et al.* 2004).

A presença do agente infeccioso/biofilme (*A. actinomycetemcomitans* e *P. Gingivalis*, por exemplo) nos tecidos periodontais deflagra uma resposta inflamatória e imunológica por parte do hospedeiro, que na tentativa de livrar o organismo dos agentes invasores acaba por determinar destruição dos componentes da matriz tecidual. De fato, na maioria das doenças inflamatória como a periodontite, a resposta inflamatória/imune do hospedeiro é o determinante da fisiopatologia da doença (MADIANOS *et al.*, 2005).

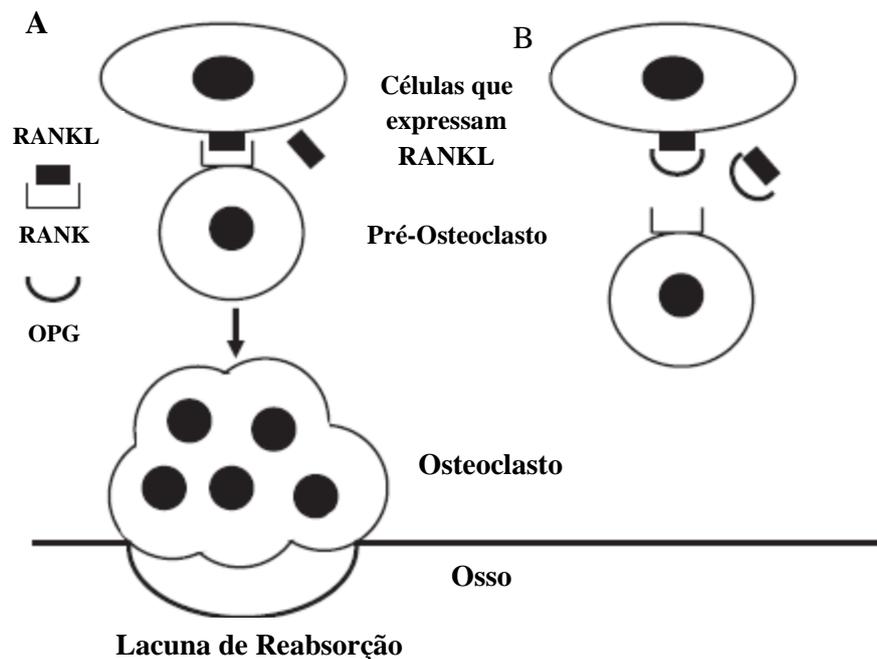


Figura 02: Representação esquemática da ação do sistema RANK/RANKL/OPG. (A) a ligação de RANKL ao seu receptor RANK (presente na superfície dos pré-osteoclastos) desencadeia uma série de processos intracelulares que levam a fusão e diferenciação dessas células em osteoclastos maduros multinucleados. Nos tecidos, os osteoclastos se posicionam na superfície óssea e, subsequentemente, reabsorvem o osso. (B) por outro lado, a ação de RANKL pode ser bloqueada pela OPG. A ligação de OPG ao RANKL impede sua interação com RANK, inibindo assim todos os eventos moleculares que levariam à diferenciação dos osteoclastos e reabsorção óssea. Fonte: Adaptado a partir de BELIBASAKIS *et al.*, 2012

A presença dessas bactérias desencadeia uma resposta caracterizada pela ativação de macrófagos e linfócitos T (TENGG, 2003). Essas células ativadas liberam RANKL e osteoprotegerina (OPG), além de mediadores da resposta inflamatória como IL- 1 β , TNF- α , PGE- 2, responsáveis por regular a diferenciação/ativação de osteoclastos resultando em reabsorção óssea (ASSUMA *et al.*, 1998; KAWAI *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2007).

Kanzanki e colaboradores (2001) demonstram através de experimentos *in vitro* que as células do ligamento periodontal produzem RANKL e OPG e podem também apoiar a osteoclastogênese através da sinalização RANKL. Posteriormente, a análise imunohistoquímica revelou uma coloração maior e menor de RANKL e OPG, respectivamente, em tecidos afetados com periodontite, quando comparados com tecidos gengivais saudáveis (CROTTI *et al.*, 2003).

Portanto, esses achados sugerem que a interação de RANK/RANKL/OPG tem função primordial no controle da remodelação óssea na periodontite (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Logo, as reações imune-inflamatórias deflagradas nos tecidos periodontais para protegê-los contra a presença, invasão e disseminação de microrganismos e seus produtos poderão afetar o osso alveolar, de modo que esses processos “defensivos” podem, paradoxalmente, responder pela maior parte da lesão tecidual observada na periodontite (MADIANOS *et al.*, 2005). A extensão e a gravidade da lesão estão relacionadas com o nível de resistência do hospedeiro aos fatores microbianos. Esse processo de amplificação da resposta imune/inflamatória envolve geração de mediadores inflamatórios como citocinas e prostaglandinas, além do recrutamento de células inflamatórias e ativação de osteoclastos, as quais formam a base do processo destrutivo que caracteriza a periodontite (HERRERA *et al.*, 2011; TOKUNAGA *et al.*, 2011).

3.5. CITOCINAS NA PERIODONTITE

As citocinas são polipeptídios extracelulares, hidrossolúveis, com peso molecular variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos. Esses polipeptídios extracelulares transmitem informações de uma célula à outra através de mecanismos autócrinos ou parácrinos (TABA *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2007; SOMMER, WHITE, 2010). Além disso, as citocinas estimulam suas células-alvo a produzir mais citocinas, amplificando a resposta imune/inflamatória (ZHANG, 2007). Ao nível molecular, as citocinas exercem seus efeitos através da ligação aos receptores de membrana que possuem atividade intrínseca de quinase, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma as citocinas podem amplificar ou inibir a resposta imune/inflamatória influenciando a diferenciação/proliferação das células imunológicas, regulando a produção e a atividade de outras citocinas (CURFS, 1997; WHITE, 2010).

Muitos estudos destacam as citocinas como importantes mediadores associados à patogênese da periodontite, como o TNF- α , IL- 1 β e IL- 17, que estimulam a reabsorção óssea diretamente por induzir a proliferação de progenitores de osteoclastos, e indiretamente por estimular a atividade de reabsorção dos osteoclastos maduros (BELIBASAKIS e BOSTANCI, 2012) e por aumentar a síntese de collagenases (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

O TNF- α é uma proteína trimérica, secretada por monócitos- macrófagos e desempenha um papel fundamental na periodontite como mediador de destruição tecidual (LINS *et al.*, 2007; ROSSOMANDO; WHITE, 1993; EBERSOLE; CAPPELLI, 2000;

SANDROS *et al.*, 2000). O TNF- α exerce importante papel na ativação dos osteoclastos, estimulando a reabsorção óssea. Essa citocina induz a produção local de prostaglandinas, induz a secreção de metaloproteinases, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em perda óssea local. (LINS *et al.*, 2007; ROSSOMANDO. WHITE, 1993; SANDROS *et al.*, 2000). Além disso, a utilização de substâncias inibidoras de TNF- α e IL- 1β , como a pentoxifilina, e mais seletivamente para TNF- α , como a talidomida, foram capazes de reduzir, de forma significativa e dose-dependente, a perda óssea alveolar e o processo inflamatório em modelo de periodontite em ratos (LIMA *et al.*, 2004).

3.6. USO DE PRODUTOS NATURAIS PELAS COMUNIDADES: OPÇÃO TERAPÊUTICA NA PERIODONTITE

O uso de plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais.

O semi-árido nordestino é considerado uma área com características sociais, econômicas e ecológicas bem particulares, uma vez que o sertanejo sobrevive, muitas vezes, à custa dos recursos bióticos para suprir suas necessidades, inclusive de medicamentos. Um estudo realizado pela SOS FARMA no Brasil revela que 91,9% das famílias utilizam plantas com fins terapêuticos e que 46,6% destas famílias cultivam essas plantas em seus próprios quintais (BEZERRA, 2001).

A OMS recomenda a prática do uso de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde como forma de diminuir os custos destes programas e ampliar o número de beneficiados, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento onde persistem os grandes bolsões de pobreza (BIESKI, 2004).

Embora a flora brasileira represente mais de 20% das espécies vegetais conhecidas no mundo, ainda se observa uma subutilização deste potencial como fonte de novas moléculas e seu consumo está normalmente associado com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tendo seu uso e indicação respaldados apenas pela própria comunidade (VEIGA JÚNIOR, 2005).

Diante desse cenário muitas têm sido as iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil, para viabilizar a utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos, tendo como linhas condutoras a preservação da biodiversidade e o desenvolvimento sustentável de uma terapêutica alternativa e complementar.

De fato, a identificação de novas fontes naturais de compostos químicos visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento como o Brasil, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas de saúde pública, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos de baixo custo, seguros e com embasamento científico, mediante a realização de pesquisas que comprovem suas propriedades farmacológicas e/ou toxicológicas (CALIXTO *et al.*, 2000).

Cimicifuga racemosa é uma planta herbácea, pertencente à família Ranunculaceae, originária do Canadá e costa atlântica dos Estados Unidos (Nomenclatura botânica oficial: *Cimicifuga racemosa*(L.) Nutt; Nome popular: Cimicifuga). 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 e ERNST, 2008).

Sua raiz/rizoma é composta de glicosídeos triterpênicos acteína, 12-acetil-acteína, 27-desoxioacteína; alcalóides quinolizínicos: N-metilcitisina, taninos, compostos ácidos (acético, butírico, fórmico, gálico, isoferúlico, oléico, palmítico, salicílico); princípio estrogênico: formononetina (isoflavona), princípios amargos, resina (acteína em complexo misto) fotoesteróis, óleo essencial.

Cimicifuga racemosa foi muito utilizada na medicina popular coreana para aliviar dor e inflamação, para o tratamento de cólicas menstruais e nos sintomas da menopausa (BOLLE *et al.*, 2007). Os americanos também tinham o hábito de utilizar *Cimicifuga racemosa* para aliviar a dor reumática crônica, tosse, resfriados (FOSTER, 1999).

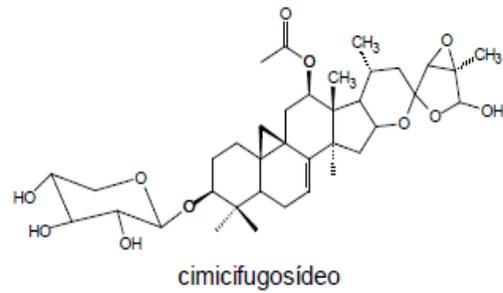
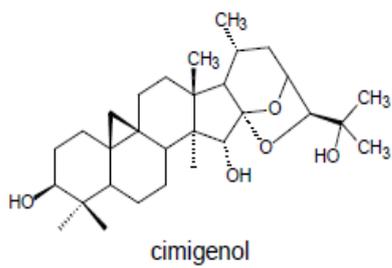
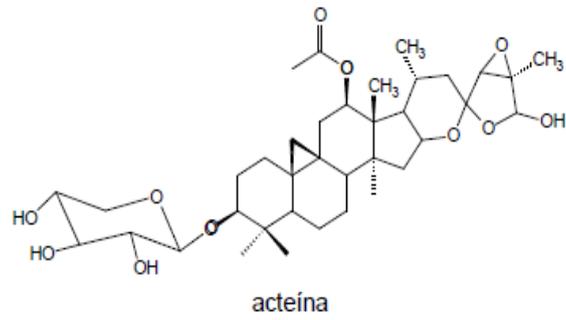
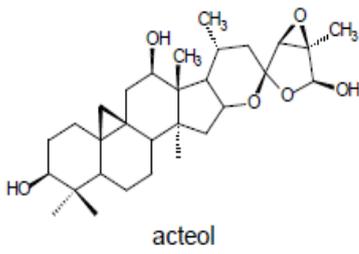
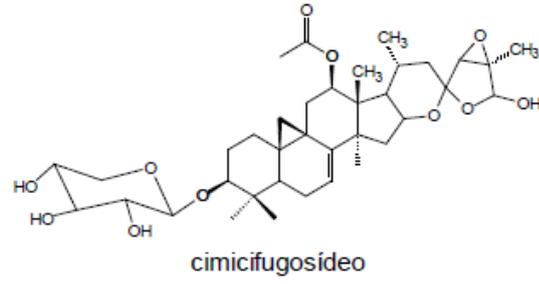
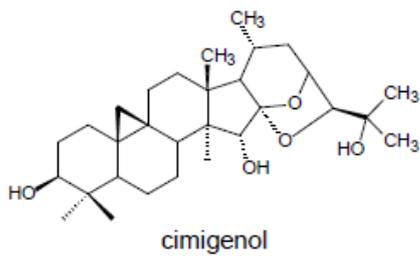
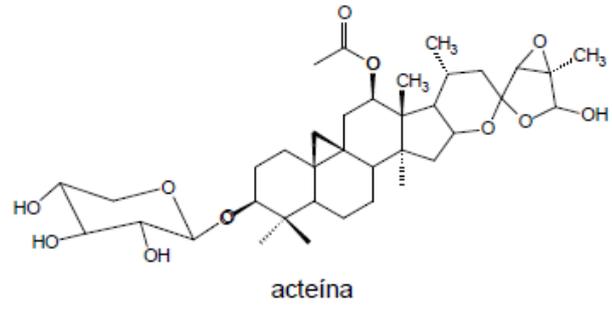
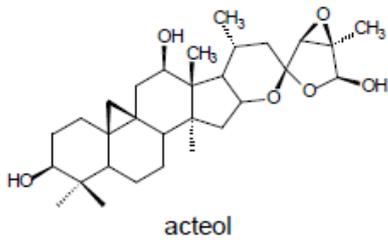
Estudos atuais demonstram que *Cimicifuga racemosa* pode aliviar os sintomas da menopausa, como doenças cardiovasculares, reabsorção óssea (osteoporose) e até mesmo depressão (MCKENNA *et al.*, 2001; MORELLI *et al.*, 2002). Ainda pode atuar como um antioxidante (BURDETTE *et al.*, 2002) e pode auxiliar em processos alérgicos (KIM *et al.*, 2004).

Sobre os efeitos adversos da planta estudos demonstram que foram raros e reversíveis e que se caracterizavam como transtornos gastrointestinais, raramente problemas hepáticos e circulatórios (HUNTLEY & ERNST, 2003).

Cimicifuga racemosa pode ser encontrada na forma de comprimidos revestidos, sob o nome fantasia de Apaluse (Laboratório Marjan Farma – São Paulo – Brasil), contendo 20 mg de extrato seco de *Cimicifuga racemosa* obtido a partir da raiz da planta. Atualmente é prescrita para o tratamento da dismenorréia e dos sintomas da menopausa (BORRELLI e ERNST, 2008).



Figura 03: Ilustração de *Cimicifuga racemosa*: Fonte: Google.



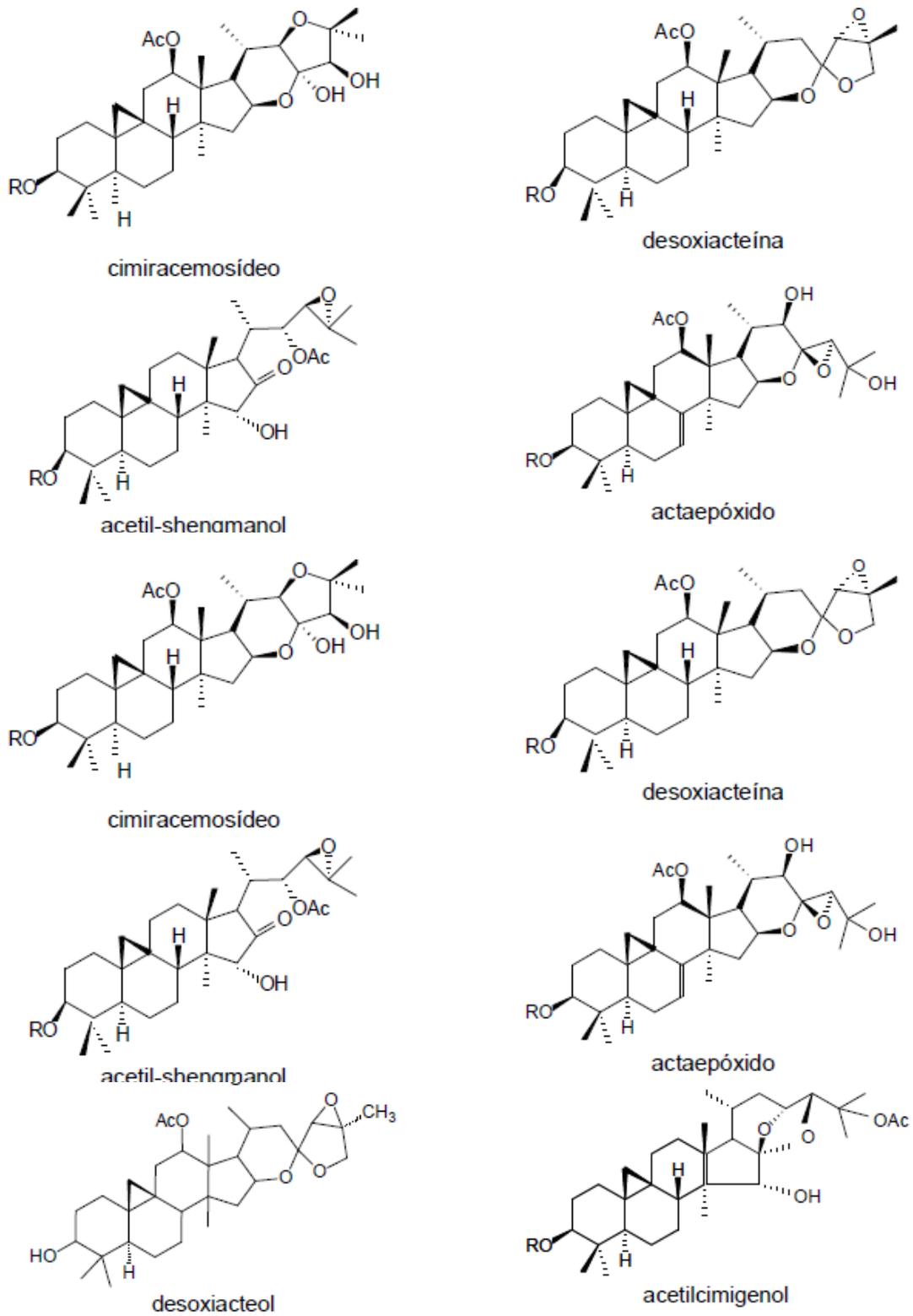


Figura 04: Estrutura dos triterpenos de *Cimicifuga racemosa*. Fonte: Adaptado a partir SILVA *et al.*, 2009.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia e segurança do fitomedicamento *Cimicifuga racemosa* em um ensaio pré-clínico de periodontite investigando o possível envolvimento do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α).

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre a perda óssea alveolar observada aos 11 dias de periodontite em ratas;
- Identificar o efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre os achados histopatológicos aos 11 dias de periodontite em ratas;
- Investigar o efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre os níveis de TNF- α aos 11 dias de periodontite em ratas;
- Analisar o efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre a integridade da mucosa gástrica aos 11 dias de periodontite em ratas;
- Avaliar os efeitos de *Cimicifuga racemosa* sobre parâmetros bioquímicos séricos (Fosfatase Alcalina Total, Creatinina, AST/ ALT).

5. METODOLOGIA

5.1. ANIMAIS

Foram utilizados oitenta (80) ratos *Wistars (Rattus norvegicus albinus)* fêmeas, pesando entre 200 e 220 gramas, fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*.

Os protocolos experimentais usados neste estudo foram submetidos a análise pela comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA- da Universidade Federal do Ceará (52/12). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais assim como o número de animais utilizados em acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL/ COBEA) e normas internacionais (Guide for care and use of laboratory animals- NIH publication 85- 23, revised 1985).

5.2. DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Água Destilada;
- Albumina sérica bovina (BSA);
- Álcool etílico 70 %;
- Anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA);
- Anticorpo primário de coelho anti-TNF- α (Santa Cruz®)
- Azul de Metileno 1 %
- *Cimicifuga racemosa* – Composição de Apresentação- |Cartela de comprimidos
- Cloreto de Sódio;
- 3,3`diaminobenzidine (DAB)
- Dietilpirocarbonato;
- EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético);
- Eosina (Merck);
- Formaldeído;
- Hematoxilina;
- Hidrato de Cloral;
- Tribromoetanol 2,5 %

5.3. OBTENÇÃO DA *Cimicifuga racemosa*

A *Cimicifuga racemosa* é um fitomedicamento que já está disponível no mercado, sob a forma farmacêutica de comprimidos (20 mg) e sob o nome fantasia Aplause (Laboratório Marjan). Para a administração de *Cimicifuga racemosa* o comprimido foi macerado com auxílio de gral e pistilo, diluído em salina e administrado por gavagem durante 11 dias consecutivos.

5.4. MODELO EXPERIMENTAL

O modelo de periodontite experimental utilizado foi o padronizado pelo nosso grupo (BEZERRA *et al.*, 2000). Os animais foram anestesiados (i.p.) com tribromoetanol 2,5 % (sigma- Aldrich) (1ml/ 100g). A periodontite foi induzida através da colocação cirúrgica de um fio de náilon (3- 0) na cervical do segundo molar superior esquerdo.

Após adaptado, o fio teve suas pontas unidas por um nó voltado para a face vestibular, ficando localizado numa posição supragengival na vestibular e subgengival na face palatina. O grupo NAIVE foi representado por animais mantidos nas mesmas condições ambientais, não submetidos a qualquer manipulação. Após a indução da periodontite os animais foram pesados diariamente para a construção de uma curva ponderal. Os animais foram eutanasiados, sob anestesia, por exsanguinação após 11 dias, quando se removeu as hemiarcadas para análise morfométrica, histopatológicas e para análise de imunohistoquímica.

5.5. PARÂMETROS AVALIADOS NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL

5.5.1. PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Após o sacrifício dos animais, as maxilas foram removidas e fixadas em formol (10 %) por 24 horas e coradas com azul de metileno (1 %) a fim de discriminar o tecido ósseo dos dentes, os quais são corados com menor intensidade. Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram montadas em blocos de cera de abelha e fotografadas em alta resolução (Cyber Short Sony, Zoon óptico 12x). As imagens digitalizadas foram analisadas por meio do software Image J® para a quantificação da perda óssea alveolar. A perda óssea alveolar foi obtida a partir do cálculo da diferença entre as medidas das áreas vestibulares dos molares com periodontite e as áreas vestibulares dos molares contralaterais saudáveis. Essa área foi inicialmente calculada em pixels que posteriormente foram convertidos em mm² pelo uso de um padrão de milímetros fixado ao lado das maxilas (LIMA *et al.*, 2004).



**Mensuração da diferença
entre a área dos molares da
maxila doente e saudável.**

Calibração



Perda Óssea em mm²

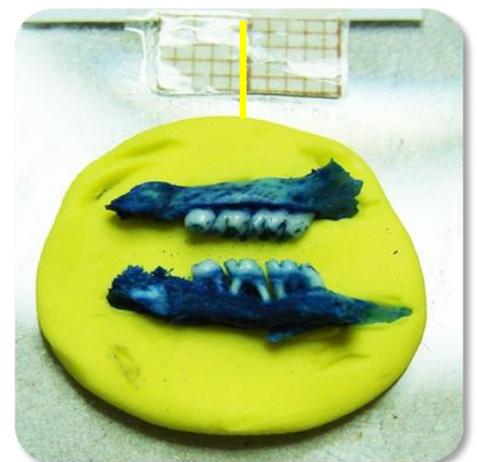


Figura 5: Esquema ilustrativo da análise da perda óssea alveolar após indução da periodontite. A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. Após a eutanásia dos animais as hemiarquadas foram removidas e coradas com azul de metileno (1%). A análise da reabsorção do osso alveolar foi realizada por um observador cego para cada experimento. Foi mensurada a diferença entre as áreas em pixels das superfícies vestibulares dos molares esquerdos (com periodontite) e direito (controle saudáveis), através do *software* ImageJ®. Fonte: Adaptado de SOUSA, 2011.

5.5.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A histopatologia do osso alveolar foi feita em cortes seriados das hemiarquadas com periodontite. Após fixação em formol a 10 %, as hemiarquadas 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 μ m) 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 (Vide Abaixo):

Tabela 1: Escores e critérios histopatológicos para análise da Periodontite

Grau 0	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado celular ausente ou discreto • Escassos/raros osteoclastos de permeio • Processo alveolar preservado • Cimento preservado
Grau 1	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado celular moderado com alguns osteoclastos • Pequena absorção do processo alveolar • Cimento preservado
Grau 2	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado celular acentuado • Processo alveolar com digestão acentuada e presença de grande número de osteoclastos • Destruição parcial do cimento
Grau 3	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrado celular acentuado • Presença de número aumentado de osteoclastos • Processo alveolar e cimento ausentes

5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

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. Resumidamente, a técnica consistiu nos seguintes passos: os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados em xilol (dois banhos durante 10 minutos cada), imersos em três passagens de álcool absoluto, lavados em água corrente e, posteriormente, foi submetido a uma passagem em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com citrato em pH 6,0 durante 30 minutos à temperatura de 99°C. Após retornar à temperatura ambiente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3 % durante 10 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-TNF- α (Santa Cruz®), por 24 horas à temperatura ambiente, na diluição de 1:50 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA), e, posteriormente, lavados com solução de PBS.

Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita incubação em solução cromógena preparada com 3,3`diaminobenzidine (DAB), durante 10 minutos em câmara escura. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, porém o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5 %. Os cortes foram então lavados em água corrente e, em seguida, com água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina, seguida de desidratação em uma série de concentrações de álcool, diafinizadas em xilol e, por fim, a lâmina foi colocada. Como controle positivo foi utilizado corte do tecido que foi submetido ao mesmo protocolo.

As lâminas foram avaliadas em microscópio KIKON Eclipse E200, e fotografadas em microscópio LEICA acoplado a computador. Os parâmetros de positividade da marcação imunohistoquímica do antígeno em todos os cortes incluídos consistiu nas células que exibiram coloração acastanhada no seu citoplasma, independente da intensidade de imunomarcação.

5.7. DOSAGEM DE CITOCINA

Aos 11 dias de periodontite, após a eutanásia dos animais, realizou-se a coleta do tecido gengival para a dosagem de TNF- α que foi realizada pelo método de ELISA, usando o Kit Quantikine_rat TNF immunoassay e seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a placa de 96 poços foi incubada por 2h à temperatura ambiente com 50 μ L/poço com as soluções padrão, amostra e controle e com o diluente de ensaio RD1-41. Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com 400 μ L de tampão de lavagem e incubada novamente por mais duas horas com 100 μ L de conjugado de TNF- α por poço. Após as duas horas, a placa foi lavada novamente e incubada por mais 30 minutos com 100 μ L da solução substrato, sendo a placa protegida da luz. Em seguida foi adicionada a placa 100 μ L da solução de parada em cada poço e a absorbância foi medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

5.8. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Uma hora após o tratamento com *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/ kg *per os*) os animais foram anestesiados (i.p.) com tribromoetanol 2,5 % (Sigma) (1ml/ 100g) e então se seguiu a indução da periodontite. A partir daí os animais foram tratados diariamente, sempre no mesmo horário com *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/ kg *per os*) durante 11 dias. Depois dos 11 dias de tratamento os animais foram eutanasiados sob anestesia, para remoção das hemiarcadas para análise morfométrica, histopatológica e para avaliação imunohistoquímica.

5.9. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS

Curva Ponderal

A massa corpórea foi medida (g) diariamente desde o tempo zero (antes da indução da periodontite até 11 dias de periodontite). Os valores encontrados foram expressos como variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial.

Efeitos sistêmicos do tratamento com *Cimicifuga racemosa* em ratas submetidas à periodontite experimental.

Após 11 dias de tratamento com *Cimicifuga racemosa* os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas a partir do ventrículo direito e centrifugados para posterior dosagem de fosfatase alcalina, creatinina, alanina amino transferase- ALT e aspartato amino transferase- AST.

Dosagem de fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em praticamente todos os tecidos do organismo, especialmente nas membranas das células dos túbulos renais, ossos (osteoblastos), placenta, trato intestinal e fígado.

Portanto, a fosfatase alcalina encontrada no soro é resultado da presença de diferentes isoenzimas originadas em diferentes órgãos, com predomínio das frações ósseas e hepáticas. Para a dosagem de fosfatase alcalina, utilizou-se o kit comercial da Labtest cinético liquiform referência 79, cuja metodologia baseia-se na Reação de Bowers e McComb modificado (substrato p-nitrofenilfosfato).

O procedimento constitui em adicionar 800 µL do reagente número 1 (contém tampão pH 10,4, HEDTA 2,0 mmol/L, sulfato de zinco 1,2 mmol/L, actato de magnésio 2,5 mmol/L, azida sódica 8 mmol/L) a 200 µL do reagente número 2 (contém p-Nitrofenilfosfato > 60 mmol/L, fenol >50 mmol/L) e 20 µL da amostra (soro), as absorbâncias foram lidas a 405 nm, em analisador bioquímico semi-automático Bioplus BIO-200F.

Dosagem de creatinina

A constância na formação e excreção da creatinina faz dela um marcador muito útil da função renal, principalmente da filtração glomerular, em virtude de sua relativa independência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismos proteico. Assim, a determinação da creatinina plasmática é um marcador de função renal mais seguro do que a uréia. Para a dosagem de creatinina, utilizou-se o kit comercial da Labtest referência 96, cuja metodologia baseia-se na Reação de Jaffé; Picrato sem Precipitação. O procedimento constitui em adicionar 0,8 mL de NaOH (solução de hidróxido de sódio 200 mmol/L), 0,2 mL de ácido pícrico (contém 22,2 mmol/L de ácido pícrico) e 50 µL da amostra. Em seguida as absorbâncias foram lidas em 510 nm em analisador semi-automático Bioplus BIO-200F.

Dosagem de AST e ALT

A enzima aspartato aminotransferase- AST é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. Está presente no citoplasma e também nas mitocôndrias e, portanto sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo. Do mesmo modo, a enzima alanina aminotransferase- ALT é encontrada abundantemente no fígado, em quantidade moderada nos rins e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática, tornando-a um marcador sensível da função do fígado.

Portanto, suas mensurações podem ser um indicador de comprometimento hepatocelular agudo. Para a dosagem de AST e ALT, utilizou-se o kit comercial da Labtest cinético liquiform referência 109 e 108 respectivamente, as metodologias baseiam-se em Cinética UV-IFCC.

O procedimento para a dosagem da enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (AST) consistiu em adicionar 800 µL do reagente número 1 (contém Tampão Tris 105 mmol/L, L-aspartato 330 mmol/L, MDH > 825 U/L, LDH > 1200 U/L e azida sódica 0,095%), 200 µL do reagente número 2 (contém Tampão Tris 20 mmol/L, NADH 1320

$\mu\text{mol/L}$, α -cetogluturato 66 mmol/L e azida sódica 0,095%) e 100 μL da amostra. As absorvâncias foram lidas a 340 nm, em analisador semi-automático Bioplus BIO-200F. Para a dosagem de Transaminase Glutâmico Pirúvica (ALT), o procedimento para a dosagem da enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (ALT) consistiu em adicionar 800 μL do reagente número 1 (contém Tampão Tris 132,5 mmol/L, L-alanina 687,5 mmol/L, LDH > 2300 U/L e azida sódica 0,095%), 200 μL do reagente número 2 (contém Tampão Tris 20 mmol/L, NADH 1320 mmol/L, cetogluturato 82,5 mmol/L e azida sódica 0,095%) e 100 μL da amostra. As absorvâncias foram lidas a 340 nm, em analisador bioquímico Bioplus BIO-200F.

5.10. ANÁLISE DA MUCOSA GÁSTRICA

Para avaliar possível efeito lesivo à mucosa gastroduodenal, os animais submetidos à administração de *Cimicifuga racemosa* tiveram seus estômagos removidos no momento do sacrifício, abertos pela grande curvatura e lavados com salina (0,9 %). A porção glandular dos estômagos foi fixada em formalina tamponada 10% durante 24h, sendo, depois, embebida em parafina. Seções de 4 μm de espessura foram desparafinizadas, coradas em hematoxilina-eosina (H&E), e examinadas em microscópio óptico. Os espécimes foram avaliados de acordo com o critério de Laine (1988). Segmentos de 1 cm de cada secção histológica foram avaliados para perda de células epiteliais (escore: 0–4), edema na mucosa (escore: 0–4) e hemorragia (escore: 0–4).

5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni, adotando-se o nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Para análise histopatológica, os dados foram expressos em mediana e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para diferenciação estatística. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism (versão 5.0).

6. RESULTADOS

6.1. Eficácia de *Cimicifuga racemosa* sobre a perda óssea alveolar no modelo de periodontite em ratas

Os animais submetidos à indução da periodontite apresentaram perda óssea alveolar que foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo naive aos 11 dias de periodontite (Figura 6). O tratamento com *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/ kg; *per os*) inibiu de forma significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$) a perda óssea alveolar observado aos 11 dias de periodontite nos animais não-tratados, com redução de 47,5%; 62,5% e 55%, respectivamente (Figura 7). A figura 7B ilustra que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a periodontite, reproduzindo os principais sinais clínicos da doença tais como: reabsorção óssea alveolar, exposição de raízes e perda de contato interdental, quando comparado aos animais sem periodontite (Figura 7A). Ainda, observa-se a redução da perda óssea nos grupos tratados com *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 1 mg/ kg) (Figura 7C, 7D e 7E, respectivamente).

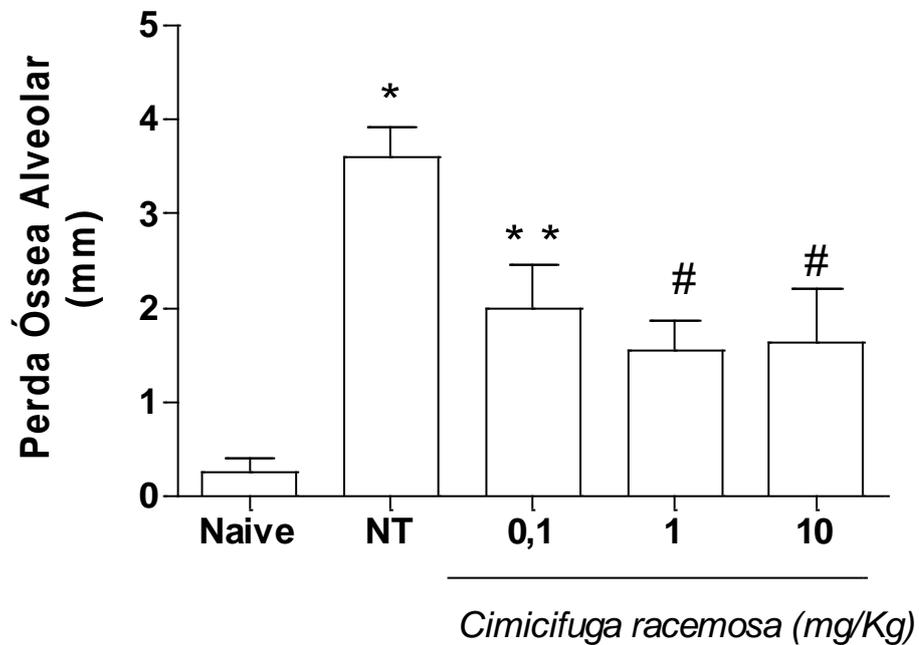


Figura 6: Efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre a perda óssea alveolar em ratas submetidas à indução de periodontite. A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/kg; v.o.) foi administrada durante 11 dias. Para análise da Perda Óssea Alveolar as maxilas foram removidas aos 11 dias de periodontite, dissecadas, fixadas (formol 10%), coradas (Azul de metileno 1%) montadas em blocos de cera de abelha e fotografadas em alta resolução (*Cyber Shot Sony DSC-H2*). As imagens digitalizadas foram analisadas por meio de software específico (*ImageJ®*) para quantificação da perda óssea. A Perda Óssea Alveolar foi obtida a partir do cálculo da diferença entre as medidas das áreas das hemiarçadas com periodontite e as hemiarçadas contralaterais (sem indução da periodontite). Os dados representam média \pm EPM (n=6 para cada tratamento). ** p< 0,05; #p< 0,01 em relação ao grupo não tratado (NT), * p< 0,05 em relação ao naive (ANOVA; Bonferroni).

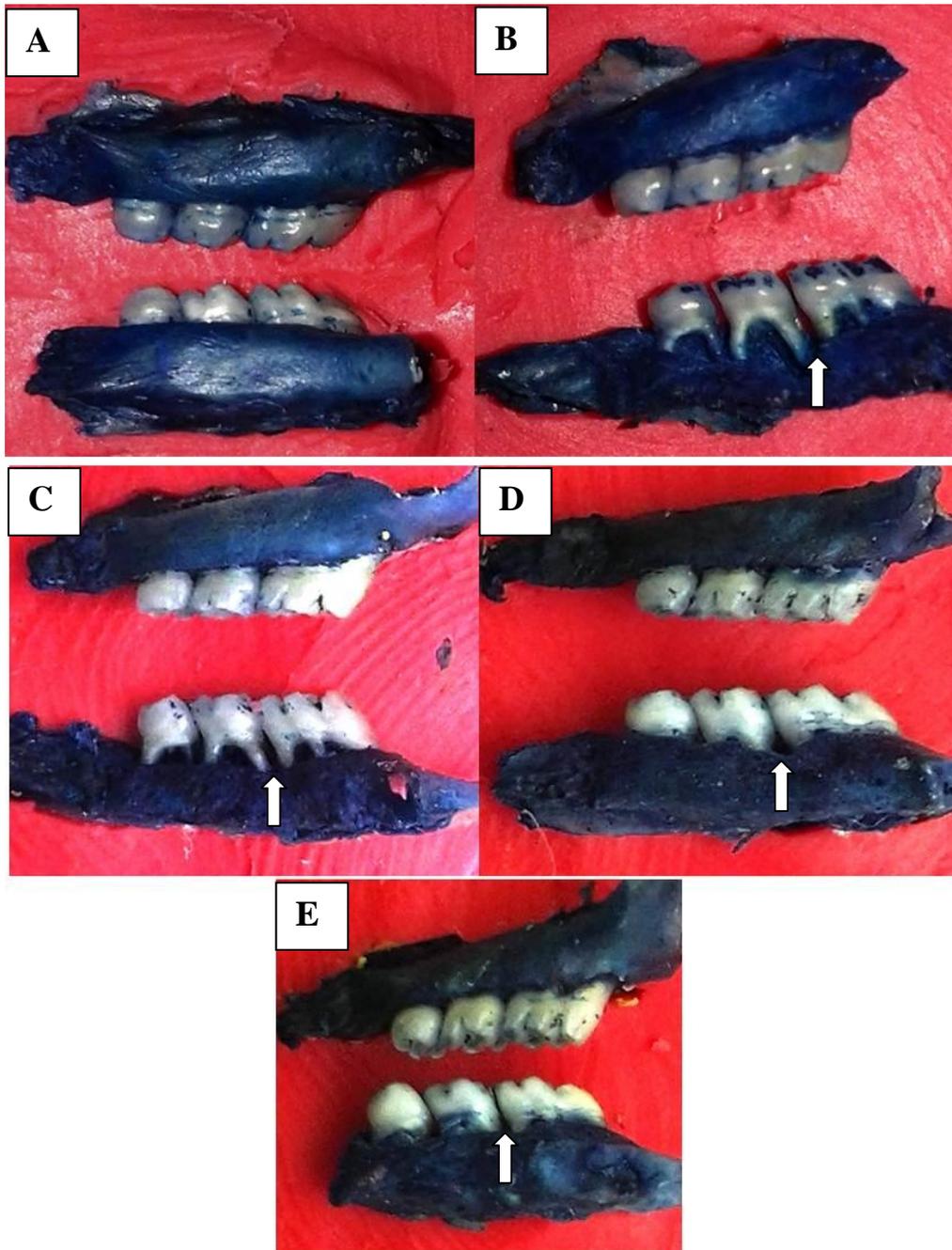


Figura 7: Fotografia ilustrativa da maxila de ratas (face vestibular) submetidas à indução da periodontite e tratados com *Cimicifuga racemosa*. Os animais receberam *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10mg/kg *per os*) ou veículo (salina) 1h antes da indução da periodontite e diariamente durante 11 dias. Os animais foram eutanasiados sob anestesia 11 dias após indução da periodontite, sendo as hemiarcadas esquerdas removidas e coradas com azul de metileno (1%). **A:** Maxila de animal não submetido à indução da periodontite (NAIVE). **B:** Maxila de animal no 11º dias de periodontite e que recebeu apenas o veículo (grupo não-tratado). **C:** Maxila de animal no 11º dia de periodontite e tratado diariamente com *Cimicifuga racemosa* (0,1 mg/kg; *per os*). **D:** Maxila de animal no 11º dia de periodontite e tratado diariamente com *Cimicifuga racemosa* (1 mg/kg; *per os*) **E:** Maxila de animal no 11º dia de periodontite e tratado diariamente com *Cimicifuga racemosa* (10 mg/kg; *per os*). Setas brancas indicam as áreas de reabsorção óssea alveolar.

6.2. Efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre as alterações histopatológicas observadas no modelo de periodontite em ratas

A análise histopatológica realizada aos 11 dias de periodontite na região entre os 1º e 2º molares superiores esquerdos das ratas revelou a presença de infiltrado celular inflamatório acentuado, reabsorção do processo alveolar com destruição parcial do cimento e presença de osteoclastos (Figura 8B). Por outro lado, a 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) mostrou infiltrado celular inflamatório discreto, preservação parcial do processo alveolar e cimento preservado (Figura 8C). O grupo naive, ou seja, os animais não manipulados cirurgicamente para indução da periodontite apresentaram estruturas preservadas (Figura 8A). A tabela 2 ilustra os escores obtidos após análise histopatológica das hemiarcadas das ratas aos 11 dias de periodontite na região entre os 1º e 2º molares superiores esquerdos.

6.3. Efeito do tratamento com *Cimicifuga racemosa* sobre a imunomarcção para TNF- α .

Observou-se acentuada marcação imunohistoquímica para TNF- α nas células do periodonto, especialmente osteoclastos (setas), aos 11 dias de periodontite nas ratas que receberam apenas o veículo (grupo não tratado) (Figuras 9C). O tratamento com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) reduziu a intensidade e a área de marcação quando comparado ao grupo não tratado (Figuras 9D).

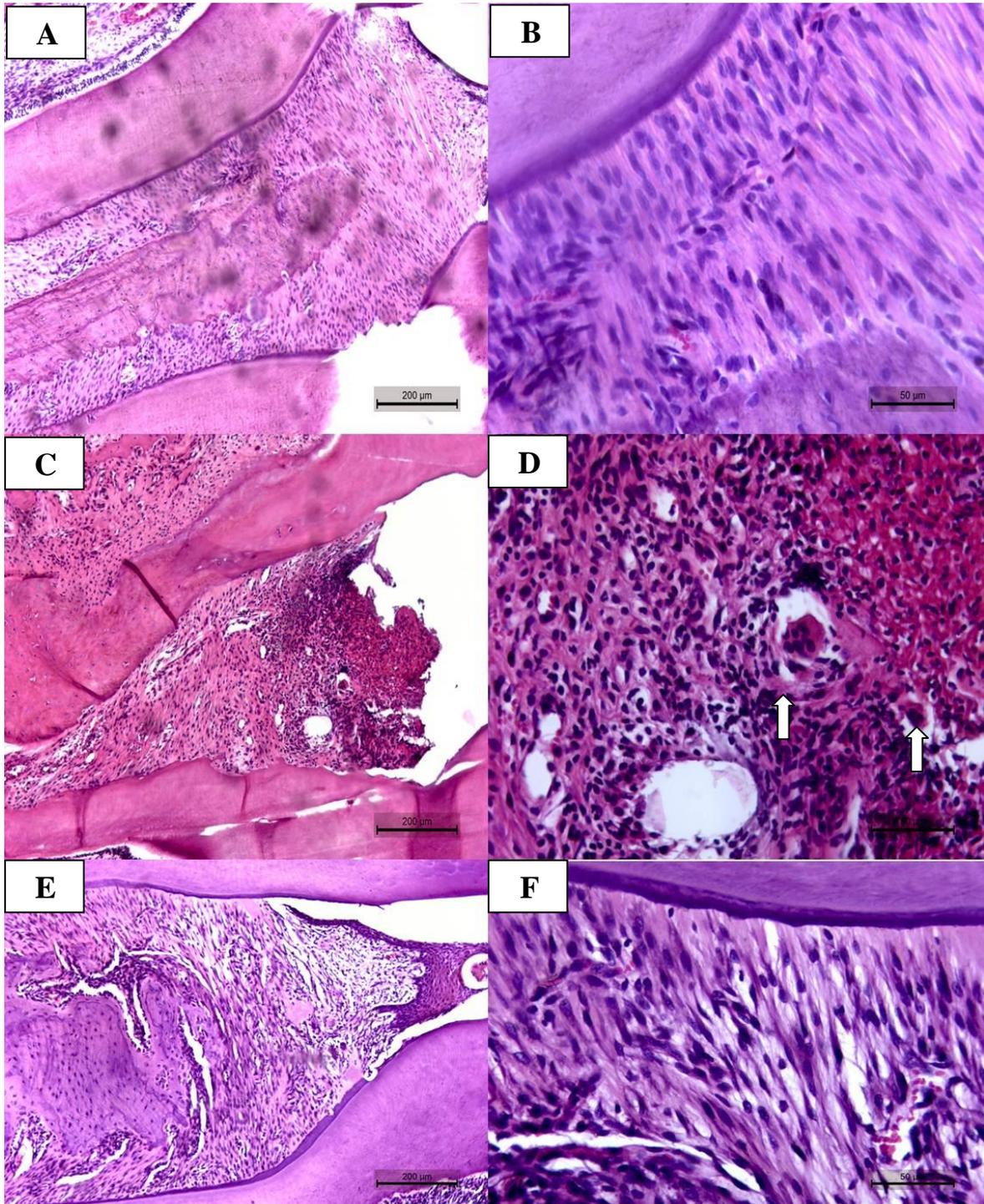


Figura 8: Microfotografia da maxila de ratas 11 dias após indução da periodontite e tratadas com *Cimicifuga racemosa*. A periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores esquerdos. **A e B.** Periodonto de animal não submetido à indução da periodontite (Naive) (Aumento de 100x e 400x, respectivamente); **C e D.** Periodonto de animal submetido à indução da periodontite e tratado apenas com o veículo (salina), apresentando intenso infiltrado celular inflamatório, reabsorção do osso alveolar e cemento. (Aumento de 100x e 400x, respectivamente); **E e F.** Periodonto de animal submetido à indução da periodontite que recebeu (*per os*) *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg), onde se observa infiltrado celular inflamatório leve, discreta reabsorção do osso alveolar com preservação do cemento. (Aumento de 100x e 400x, respectivamente).

Tabela 2: Efeito do tratamento com *Cimicifuga racemosa* na análise histopatológica da maxila de ratas submetidas à periodontite

	<i>Cimicifuga racemosa</i>				
	Naive	Não tratado	0,1	1	10
Mediana e Variação	0(0-0)	2(1-3)	1 (1-2)	1 (0-1)*	1 (0-2)

A periodontite foi induzida em ratas, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores esquerdos. *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/kg; *per os*) foi administrada diariamente durante 11 dias. Os animais foram eutanasiados no 11º dia após indução da periodontite, sendo as hemiarcadas esquerdas removidas e processadas para coloração por H&E. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 5 animais, avaliando-se na região entre os 1º e 2º molares s seguintes parâmetros: infiltrado celular inflamatório, presença de osteoclastos e grau de preservação do processo alveolar e cemento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não-tratado (Kruskal-Wallis; Dunn's).

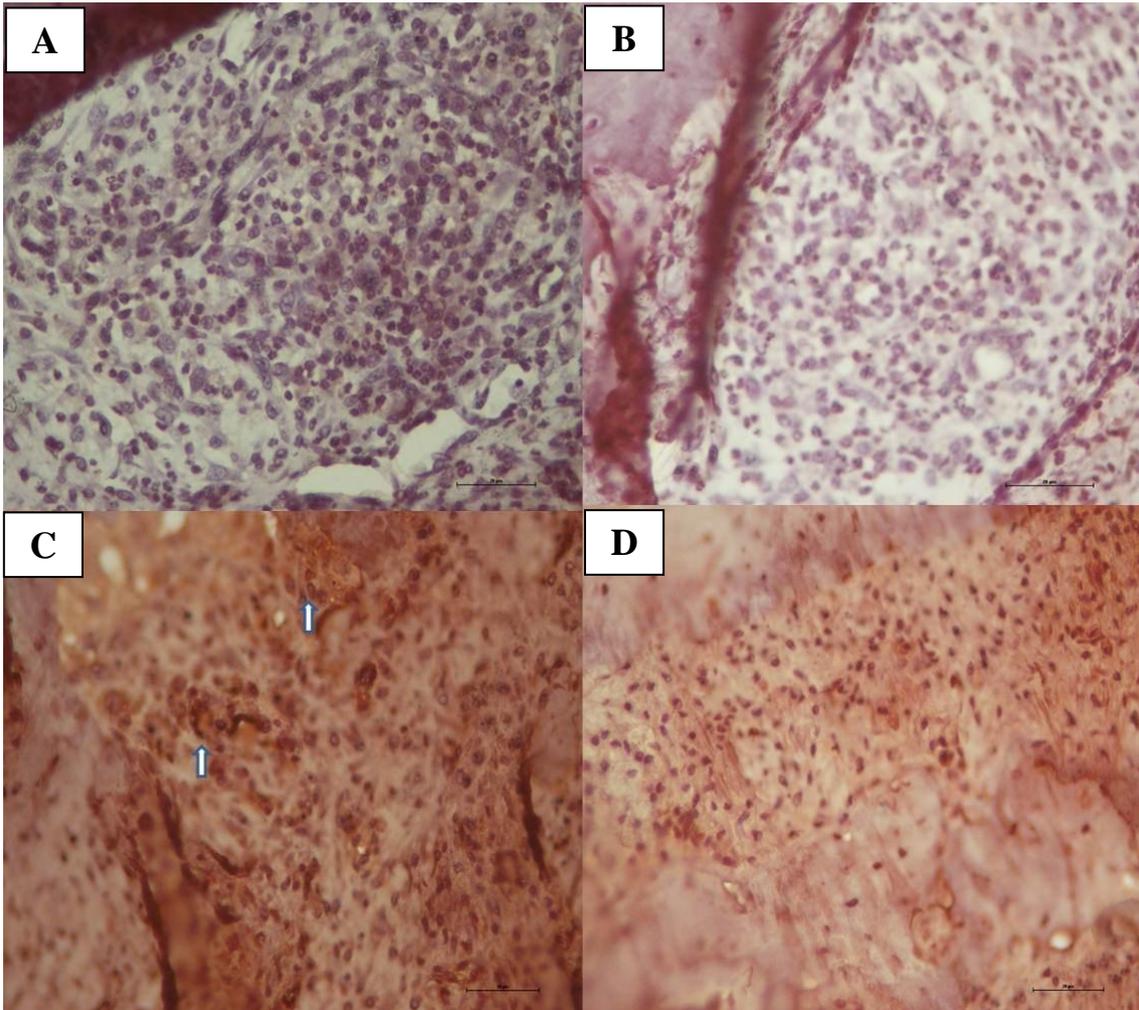


Figura 9: Efeito do tratamento com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) sobre a análise imunohistoquímica para o Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α) na maxila de animais submetidos à indução da periodontite. A Periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) ou salina foram administradas 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias após a indução da periodontite. Os animais foram sacrificados, sob anestesia, 11 dias após a indução da periodontite. **A e B.** Controle negativo da reação, os animais receberam apenas PBS; **C.** Maxila de animal que foi submetido à periodontite e que recebeu apenas o veículo (grupo não tratado), mostrando intensa marcação para TNF- α . **D.** Maxila de animal submetido à periodontite e tratado com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg), mostrando redução da marcação para TNF- α . Aumento 400.

6.4. Efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no tecido gengival aos 11 dias de periodontite

Aos 11 dias de periodontite observou-se a formação TNF- α nos tecidos gengivais (Figura 10). O tratamento com *Cimicifuga racemosa* reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a quantidade de TNF- α nos tecidos gengivais, quando comparado ao grupo não tratado (salina) (Figura 10).

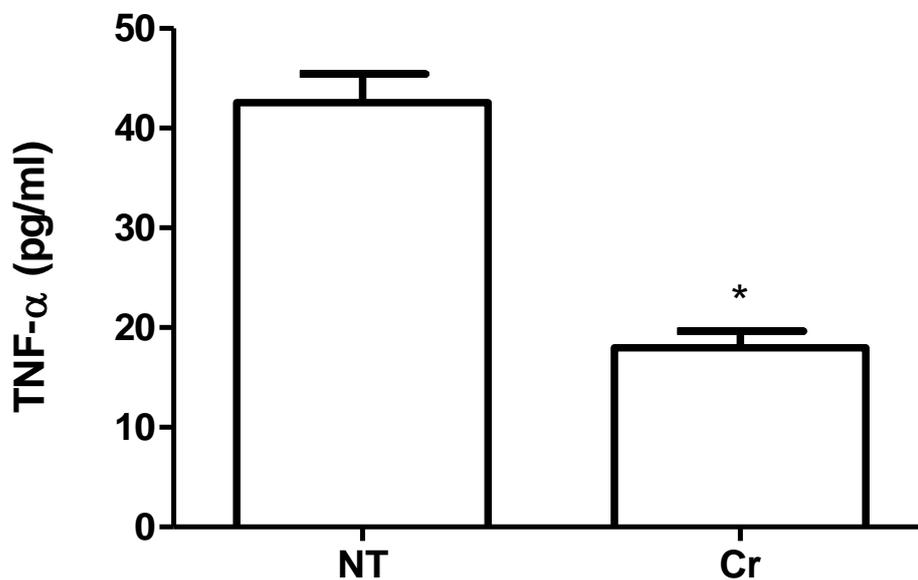


Figura 10: Efeito da *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) sobre a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em gengivas de ratas submetidas à periodontite. A periodontite foi induzida através da colocação de um fio de náilon (3.0) em torno dos segundos molares superiores esquerdos das ratas. *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) ou salina foram administradas 30 minutos antes e diariamente durante 11 dias após a indução da periodontite. Os animais foram sacrificados, sob anestesia, 11 dias após a indução da periodontite. As gengivas na região dos molares superiores esquerdos foram removidas, sendo processadas para análise de TNF- α por ELISA. Os animais tratados com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) obtiveram uma redução da produção de TNF- α quando comparados ao grupo não tratado. * $p < 0,05$ em relação ou grupo não tratado. (teste t)

6.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SISTÊMICOS

6.5.1. Análise da variação da Curva Ponderal

Observou-se na análise da variação de massa corpórea dos animais durante a progressão da periodontite que inicialmente todos os animais apresentaram uma perda de peso após o primeiro dia, contudo houve uma tendência de aumento de massa corpórea ao longo do experimento. Os animais tratados com *Cimiciguga racemosa* (0,1; 1; ou 10 mg/kg) não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) de massa corpórea em relação ao grupo- não tratado (Figura 11).

6.5.2. Parâmetros Bioquímicos: Dosagem de Fosfatase Alcalina, Creatinina, AST e ALT.

O tratamento dos animais com *Cimiciguga racemosa* (0,1; 1 ou 10mg/kg; v.o.) não afetou ($p < 0,05$) os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (FAt), creatinina, assim como os níveis séricos das enzimas hepáticas (TGO/AST e TGP/ALT), quando comparado aos animais não-tratados (Tabela 3).

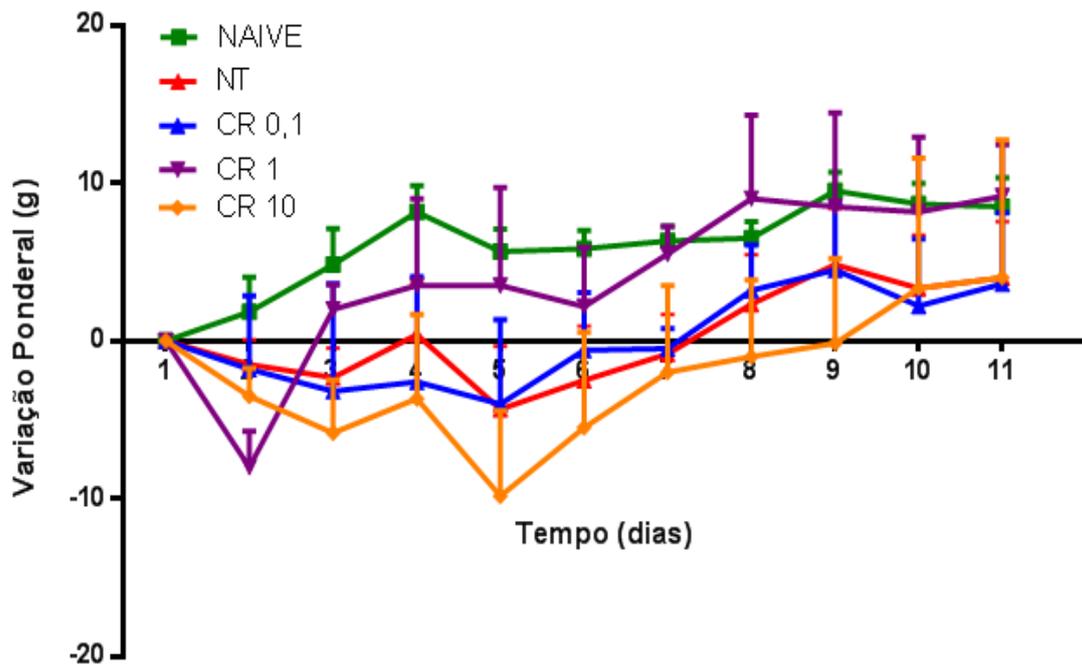


Figura 11: Efeito do tratamento com *Cimicifuga racemosa* sobre a curva ponderal de ratas submetidas à indução da periodontite. A periodontite foi induzida, sob anestesia, através da colocação de um fio de náilon na cervical dos segundos molares superiores. A administração de *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10 mg/kg v.o) foi realizada 1h antes da indução da periodontite e diariamente durante 11 dias. Os animais foram pesados diariamente, observando-se a variação (g) do peso antes da indução da periodontite. O grupo não-tratado (NT) representa animais submetidos à indução da periodontite e tratados com veículo (salina). Os dados representam à média \pm EPM da variação ponderal (g). (ANOVA).

Tabela 3: Avaliação do tratamento *Cimicifuga racemosa* sobre parâmetros bioquímicos em ratas submetidas à indução de periodontite.

Parâmetro	Naive	Veículo	<i>Cimicifuga racemosa</i> (0,1mg/kg)	<i>Cimicifuga racemosa</i> (1mg/kg)	<i>Cimicifuga racemosa</i> (10mg/kg)
Fosfatase Alcalina	84,75 ± 8,47	76,24 ± 4,06	88,08 ± 5,82	82,43 ± 8,80	87,30± 2,84
Creatinina	0,78 ± 0,05	0,64 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,68 ± 0,04	0,71 ± 0,04
TGO	114,4± 7,26	123,8± 7,66	103,6 ±3,12	96,38± 3,66	106,1± 4,46
TGP	64,40± 4,21	63,82 ± 4,17	59,62 ± 4,56	62,82 ± 4,60	55,28 ± 4,30

Valores estão demonstrados como média ± S.E.M.

6.5.3. Análise histopatológica da mucosa gástrica

A análise microscópica dos estômagos dos animais revelou que não houve nenhuma diferença entre os animais tratados com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg) e aqueles que receberam apenas o veículo (grupo não tratado) (Figura 12 e tabela 4).

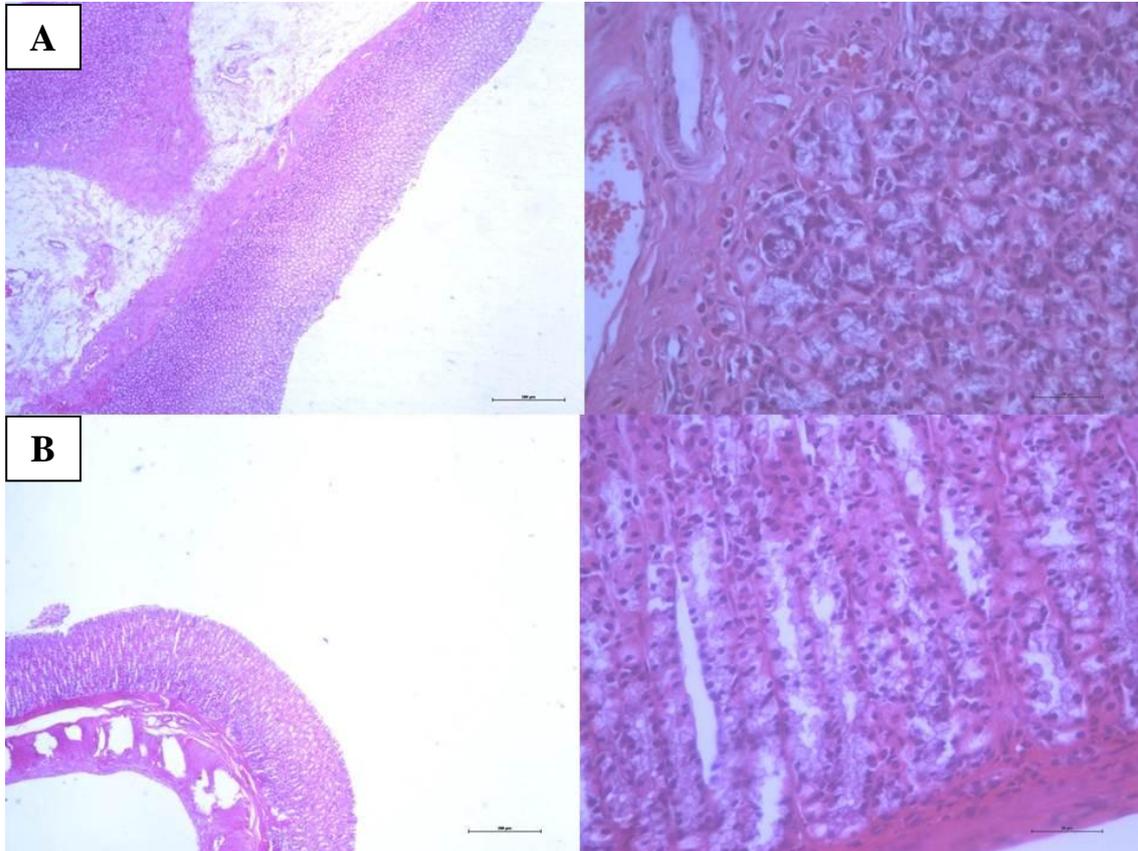


Figura 12: Fotomicrografias da mucosa gástrica de animais tratados com *Cimicifuga racemosa* e submetidas à indução da periodontite. A. Grupo não tratado; B. Grupo tratado com *Cimicifuga racemosa* (1mg/kg mostrando a integridade da mucosa gástrica). A e B: Aumento 100x e 400x, respectivamente.

Tabela 4: Análise do efeito de *Cimicifuga racemosa* sobre a mucosa gástrica de ratas submetidas à periodontite.

Grupos Experimentais	Perda de células epiteliais	Edema	Lesão hemorrágica
Não Tratado	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
<i>Cimicifuga racemosa</i> (1mg/kg)	0(0-1)	0(0-3)	0(0-0)

Os valores estão demonstrados como média \pm S.E.M.

7. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou o efeito protetor da *Cimicifuga racemosa* na perda óssea em modelo de periodontite experimental em ratas. A *C. racemosa* é utilizada em todo o mundo para o alívio dos sintomas da menopausa (VERMES *et al.*, 2005), em doenças cardiovasculares, na osteoporose, como antioxidante e, ainda, no tratamento da inflamação alérgica (MCKENNA *et al.*, 2001; MORELLI *et al.*, 2002; BURDETTE *et al.*, 2002 e KIM *et al.*, 2004). Nenhum trabalho, até o momento, mostrou o seu envolvimento no mecanismo de perda óssea alveolar. O tratamento com *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10mg/ kg *per os*), em nosso estudo, reduziu de forma significativa 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^a). Outros estudos demonstram que o extrato isopropanólico de *C. racemosa* reduz a perda óssea e melhora a qualidade do osso (NISSLEIN & FREUDENSTEIN, 2003;). Qiu e colaboradores (2007) já demonstraram *in vitro* que um dos componentes de *Cimicifuga racemosa* (25-acetilcimigenol-xilopiranosídeo) inibe a osteoclastogênese.

Em virtude de sua etiopatogenia complexa e, provavelmente, multifatorial, a periodontite está relacionada não somente ao controle da atividade de osteoclastos. Destacam-se também, como componentes importantes, a presença de agentes infecciosos contidos no biofilme dental, as respostas inflamatória e imune do hospedeiro e nestas, a participação de citocinas, mediadores inflamatórios lipídicos e enzimas responsáveis pela degradação da matriz tecidual, denominadas genericamente Metaloproteinases da Matriz (MMP). Baixos níveis de MMP estão presentes nos tecidos normais. Durante condições inflamatórias ou de dano tecidual, a expressão de MMP é aumentada pela ação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e TGF- β . As MMP têm como função a degradação de macromoléculas da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos (McCARTHY *et al.*, 2008). Kusano e colaboradores (2001) demonstraram que os compostos presentes no rizoma de outras espécies do gênero *Cimicifuga* são capazes de prevenir a degradação do colágeno através da inibição de MMP do tipo colagenase, atuando tanto na cicatrização de feridas como nos processos inflamatórios. Fundamentados nessas informações, pode-se sugerir que a inibição da reabsorção óssea alveolar demonstrada no presente estudo envolve outros mecanismos, como a inibição das colagenases (MMP) e a inibição do processo inflamatório subjacente à periodontite.

Nossos resultados da análise histopatológica das hemiarcadas do grupo controle (salina) mostraram a presença de intenso infiltrado celular inflamatório, destruição total do processo alveolar e do cimento, achados que conferem com os estudos de Lima e colaboradores (2000) e de Leitão e colaboradores (2004). Os animais tratados com *C. racemosa* na dose de 1mg/kg revelaram significativa redução do número de osteoclastos, preservação do processo alveolar e cimento, e uma redução do infiltrado celular inflamatório, quando comparados aos animais do grupo controle (salina). Estes resultados mais uma vez corroboram com estudos da *C. 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^a; e QIU *et al.*, 2007).

O Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α) é um importante mediador associado à reabsorção óssea, aspecto marcante na fisiopatologia da periodontite, modulando a atividade de osteoblastos/osteoclastos. De fato, a ação do TNF- α sobre a osteoclastogênese ocorre indiretamente pelo aumento da expressão de IL-1 e RANKL nos osteoblastos, enquanto também facilita diretamente a diferenciação de osteoclastos a partir de macrófagos da medula ativadas por RANKL (LAM *et al.*, 2000; KITaura *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2005; BELIBASAKIS e BOSTANCI, 2012). Além disso, alguns autores demonstraram que TNF- α estimula a produção local de prostaglandinas, induz a secreção de MMP, as quais realizam a dissolução da matriz orgânica secretada pelo osteoblasto, resultando em incremento da perda óssea local (WHITE, 1993; SANDROS *et al.*, 2000; LINS *et al.*, 2007; ROSSOMANDO; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

No presente estudo, com a finalidade de avaliar o envolvimento de TNF- α no modelo de periodontite em ratas, foi realizada imunohistoquímica em cortes de maxila para a marcação de TNF- α , assim como a dosagem dessa citocina em tecido gengival. A análise dos resultados revelou aos 11 dias de periodontite um grande número de células imunomarcadas para TNF- α , além de níveis aumentados dessa citocina nos tecidos gengivais, o que está de acordo com a literatura corrente (LIMA *et al.*, 200; LIMA *et al.*, 2004). Portanto, os resultados do presente estudo ratificam o envolvimento do TNF- α na fisiopatologia da periodontite. Com base nesses resultados, no presente estudo avaliou-se o possível efeito da *C. racemosa* sobre a produção de TNF- α . O tratamento com *C. racemosa* (1mg/kg) reduziu a marcação para TNF- α nos cortes de maxilas, assim como os níveis dessa citocina nos tecidos gengivais, o que está de acordo com o trabalho de Schmid e colaboradores (2009), que

obtiveram diminuição da concentração de TNF- α em sangue humano após administração de compostos presentes no extrato de *C. racemosa*. Outrossim, Shin e colaboradores (2004) e Qiu e colaboradores (2007) mostraram que componentes do extrato de *C. racemosa* são capazes de inibir a translocação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e posterior produção e liberação de TNF- α .

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 hepáticas AST e ALT, evidenciando que não houve alterações hepáticas oriundas do uso de *Cimicifuga racemosa* (0,1; 1 ou 10mg/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* (0,1; 1 ou 10mg/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.

Outro objetivo do trabalho foi analisar a integridade da mucosa gástrica após os 11 dias de tratamento de periodontite em ratas com *C. racemosa* (1 mg/kg). Trabalhos demonstraram o efeito deletério de *C. racemosa* sobre a mucosa gástrica (DOG *et al.*, 2003). A avaliação dos parâmetros microscópicos das mucosas gástricas dos animais que utilizaram a *C. racemosa*, quando comparados ao grupo não tratado, mostrou ausência de edema, hemorragia ou perda de células epiteliais. A ausência de efeito gástrico, embora a literatura já afirme a raridade destes eventos (LÜDE *et al.*, 2007), pode ser devida às doses utilizadas em nosso estudo (1,0 mg/kg), tendo em vista que os diversos trabalhos utilizam doses acima de 40 mg/kg. Neste sentido, o conjunto das nossas análises confirmam que o tratamento com *C. racemosa* exibe segurança satisfatória no modelo utilizado.

8. CONCLUSÕES

- *Cimicifuga racemosa* é eficaz na redução da perda óssea alveolar aos 11 dias de periodontite em ratas;
- O efeito terapêutico de *Cimicifuga racemosa* no modelo de periodontite envolve a redução dos níveis de TNF- α nos tecidos periodontais;
- A administração de *Cimicifuga racemosa* é uma opção terapêutica segura no modelo de periodontite em ratas.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; PIESCO, N. P.; JOHNS, L. P.; RICCELLI, A. E. Differential expression of IL- 1b, TNF-a, IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. **J Dent Res.** v. 74, p. 1057- 65, 1995.
- AGRAWAL, P.; SANIKOP, S.; PATIL, S. New developments in tools for periodontal diagnosis. **Int Dent J.** v. 62 n.2, p. 57-64, 2012.
- ALBANDAR, J. M. A 6-year study on the pattern of periodontal disease progression. **J. Clin. Periodontol.** v. 17, n. 7.1, p. 467–471, 1990.
- ALENCAR, V. B.; BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ABREU, A. L.; BRITO, G. A.; ROCHA, F. A.; RIBEIRO, R. A. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.** v. 73, n. 3, p. 251-6, mar. 2002.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP.** v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
- ARAUJO M. G.; SUKEKAVA F. Epidemiologia da Doença Periodontal na América Latina. **R. Periodontia,** v. 17, 2007.
- ARAUJO, M. G.; SUKEKAVA, F. Epideomologia da doença periodontal na América Latina. **Periodontia.** v.17, n. 2, p. 7-12, 2007.
- ASHRAF, J.; BOKHARI, S. H. A.; MANZOOR, S.; KHAN, A. A. Poor Oral Health and Coronary Artery Disease: A Case-Control Study. **J Periodontol.** v. 83, n. 11, 2012.
- ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J Immunol.** v. 160, p. 403-9, 1998.
- BARBATO, P. R.; NAGANO, H. C. M.; ZANCHET, F. N.; BOING, A. F.; PERES, M. A. Perdas dentárias e fatores sociais, demográficos e de serviços associados em adultos brasileiros: uma análise dos dados do Estudo Epidemiológico Nacional (Projeto SB Brasil 2002-2003). **Cad. Saúde Pública,** Rio de Janeiro, v. 23, n. 8, p.1803-1814, 2007.
- BAZAN, N. G. COX-2 as a multifunctional neuronal modulator. **Nature Medicine.** v. 7; p.414-415, 2001.

BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **J Clin Periodontol.** v.39, p. 239–248, 2012. BELIBASAKIS, G. N.; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. **J Clin Periodontol.** v. 39, n. 3, p. 239-48, 2012.

BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 35, n. 5, p. 613-6, May. 2002.

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

BIESKI, I. G. C. **Marketing das Plantas Mediciniais na Saúde Pública**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/marketing.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2011.

BLAIR, H. C.; TEITELBAUM, S. L.; GHISELLI, R.; GLUCK, S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. **Science.** v. 245, p. 855–7, 1989.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; PERRONE, F.; EVANDRI, M. G. Estrogen-like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* assays. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.107, n.3-5, p.262- 9, 2007.

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

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

BOYLE, W. J.; IMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** v. 423, p. 337-342, 2003.

BURDETTE, J. E.; CHEN, S. N.; LU, Z. Z.; XU, H.; WHITE, B.E.; FABRICANT, D. S.; LIU, J.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; CONSTANTINOU, A. I.; VAN BREEMEN, R. B.; PEZZUTO, J. M.; BOLTON, J. L. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 7022–7028, 2002.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CERRI, PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**. v. 286, p. 833-40, 2005.

CHEN, S.N.; FABRICANT, D. S.; LU, Z. Z.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R. Cimicifugosides I-P, new 9,19- cyclolanostane triterpene glycosides from *Cimicifuga racemosa*. **Journal of Natural Products**, v.65, n.10, p.1391-7, 2002.

COCHRAN, D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol**, v. 79, p. 1569-1576, 2008.

CROTTI, T.; SMITH, M. D.; HIRSCH, R.; SOUKOULIS, S.; WEEDON, H.; CAPONE, M.; AHERN, M. J.; HAYNES, D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **Journal of Periodontal Research**. v. 38, p. 380–387, 2003.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**. v. 10, p. 742-780, 1997.

DEA, S. L.; TÇRÇKA, M.; DIETERLE, S. A.; KNAPPA, A. C.; KAEUFELER, B. R.; SPORNITZ, D.; HENB, H. L. A. Hepatic effects of *Cimicifuga racemosa* extract in vivo and in vitro. **Cell. Mol. Life Sci.**v. 64, p. 2848–57, 2007.

DESTAING, O.; SALTEL, F.; GEMINARD, J. C.; JURDIC, P.; BARD, F. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. **Mol Biol Cell**. v. 14, p. 407–16, 2003.

Dog, T. L.; Powell, K. L.; Weisman, S. M. Critical evaluation of the safety of *Cimicifuga racemosa* in menopause symptom relief. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**. v. 10(4), p. 299-313, 2003.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2001.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. v. 1, n.1, p.10-15, 2003.

ERBESOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontol.** v.23, p. 19-49, 2000.

FENG, X. Chemical and Biochemical Basis of Cell- Bone Matrix Interaction in Health and Disease. **Curr Chem Biol.** v. 3, n. 2, p. 189-196, 2009.

FIEHN, N.E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R.T. Periodontal bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous Streptococcus sanguis. **J. Periodont Res.** v. 27, n. 6, p. 609-14, nov. 1992.

FREI-KLEINER, S.; SCHAFFNER, W.; RAHLFS, V.W.; BODMER, C.; BIRKHAUSER, M. Cimicifuga racemosa dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebocontrolled clinical trial. **Maturitas.** v. 51, n. 397-404, 2005.

GARANT, P. R.; CHO, M. I. Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. I. Histometric and histologic study. **J Periodontal Res.** v.14, n.4, p. 297-309, july 1979.

GRÓSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWAISKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALIRISKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** v. 30, p. 1046-1052, 2003.

HALL, T. J.; CHAMBERS, T. J. Molecular aspects of osteoclast function. **Infl amm Res.** v. 45, p. 1-9, 1996.

HAN, D. H.; LIM, S.; KIM, J. B. The Association of Smoking and Diabetes With Periodontitis in a Korean Population. **J Periodontol.** v. 83, n. 11, p. 1397-406, nov. 2012.

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.** v. 90; n. 10; p. 1164-1170, 2011.

HERRERA, B. S.; MARTINS, R. P.; DANTAS, A. M.; CAMPI, P.; SPOLIDORIO, L. C.; COSTA, S. K. P.; DYKE, T. E. V.; GYURKO, R.; MUSCARA, M. N. INOS-Derived nitric oxide stimulates osteoclast activity and alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontol.** v. 82, p. 608-1615, 2011.

HIRATA, A.; MURAKAMI, Y .; ATSUMI, T.; SHOJI, M.; OGIWARA, T.; SHIBUYA, K. Ferulic acid dimer inhibits lipopolysaccharide- stimulated cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **In Vivo**. v. 19, n. 5, p. 849-853, 2005.

HOSODA, A.; OZAKI, Y.; KASHIWADA, A.; MUTOH, M.; WAKABAYASHI, K.; MIZUNO, K. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. **Bioorg. Med. Chem.** v. 10, n. 4, p. 1189-1196, 2002

HOWELL, T. H.; WILLIAMS, R. C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 4, p.177–96, 1993.

HUNTLEY, A.; ERNST, E. A systematic review of the safety of black cohosh. **Menopause**, v.10, n.1, p.58-64, 2003.

JIN, Q.; CIRELLI, J. A.; PARK, C. H.; SUGAI, J. V.; TABA Jr, M.; KOSTENUIK, P. J.; GIANNOBILE, W. V. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **J Periodontol.** v. 78, p. 1300-1308, 2007.

JIN, Q.; CIRELLI, J. A.; PARK, C. H.; SUGAI, J. V.; TABA, J. R. M.; KOSTENUIK, P. J.; GIANNOBILE, W. V. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in ,experimental periodontitis. **J Periodontol.** v. 78, p. 1300-1308, 2007.

KAJIYA, M.; GIRO, G.; TAUBMAN, M. A.; HAN, X.; MAYER, M. P.; KAWAI, T. (2010) Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. **Journal of Oral Microbiology** . 2. 2010

KANZAKI, H.; CHIBA, M.; SHIMIZU, Y.; MITANI, H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. **Journal of Dental Research.** v. 80, p. 887–891, 2001.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **Am J Pathol.** v. 169, p. 987-998, 2006.

KELES, G. C.; ACIKGOZ, G.; AYAS, B.; SAKALLIOGLU, E.; FIRATLI, E. Determination of systemically& locally induced periodontal defects in rats. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, p. 176-184, 2005.

KENNEDY, J. E.; POLSON, A. M. Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. **J. Periodontol.** v. 44, p. 140, 1973.

KIM, C D.; LEE, W.K.; LEE, M. H.; CHO, H. S.; LEE, Y . K .; ROH, S. S. Inhibition of mast cell-dependent allergy reaction by extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** v. 26, n. 2, p. 299-308, 2004.

KINNEY, J. S.; DARBY, I. B.; SAID, S.; LUOTO, H.; SORSA, T.; TIKANOJA, S.; MANTYLA, P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. **J. Periodontal Res.** v. 38, p. 400-404, 2003.

KITAURA, H.; SANDS, M. S.; AYA, K.; ZHOU, P.; HIRAYAMA, T.; UTHGENANNT, B.; WEI, S.; TAKESHITA, S.; NOVACK, D. V.; SILVA, M. J. Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-a-induced osteoclastogenesis in vivo. **J. Immunol.** V. 173, p. 4838–4846, 2004.

KLAUSEN, B.; Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontal.** v. 62, n. 1, p.59-73, jan. 1991.

KOBAYASHI, Y.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanism of bone resorption: roles of bone remodeling-regulatory cytokines osteokinesin osteoclast differentiation and function. **Nippon Rinsho.** v. 61, n. 2, p. 200-206, 2003.

KOBAYASHI-SAKAMOTO, M.; HIROSE, K.; ISOGAI, E.; CHIBA, I. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by Porphyromonas gingivalis in endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 315, p. 107–112, 2004.

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.

LALLAM-LAROYE, C.; ESCARTIN, Q.; ZLOWODZKI, A. S. Periodontitis destructions are restored by synthetic glycosaminoglycan mimetic. **J Biomed Mater Res A.** v. 79, n. 3, p. 675-83, 2006.

LAM, J.; TAKESHITA, S.; BARKER, J. E.; KANAGAWA, O.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. TNF-a induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **J. Clin. Invest.** V. 106, p. 1481–1488, 2000

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.

LERNER, U. H. New Molecules In The Tumor Necrosis Factor Ligand And Receptor Superfamilies With Importance For Physiological And Pathological Bone Resorption. *Critical. Reviews in Oral Biology and Medicine*. v.15, p. 64– 81, 2004.

LIMA, V. ; BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Principais Mediadores Inflamatórios Envolvidos na Fisiopatologia da Periodontite – Papel de Moduladores Farmacológicos. **R. Periodontia**. v. 13, n. 03, 2008.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A.; BRITO, G. A. C, LIMA, V. A. R., ALENCAR, V. B. M. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci**. v. 108, p. 123-129, 2000.

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**. v.108, n.2, p.123-9, 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of TNF- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J Periodontol**. v. 75, n. 1, p. 156-62, 2004.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A.; BRITO G. A. C.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci**. V. 108, n. 2, p. 123-9, apr. 2000.

LINS, R. D. A. U.; PEQUENO, M. T.; MELO, J.P.L.C.; FERREIRA, R. C. Q.; SILVEIRA, E. J. D.; DANTAS, E. M. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Ver. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac**. v. 7, n. 2, p. 29-36, 2007.

LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X.; GAO, Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissue from generalised aggressive periodontitis. **J. Periodontol**. v. 72, n. 11, p. 1545-1553, 2001.

LOE, H.; THEILANDE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**. v.36, p.177–87, 1965.

LUXENBURG, C.; GEBLINGER, D.; KLEIN, E.; ANDERSON, K.; HANEIN, D.; GEIGER, B.; ADDADI, L. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. **Plos one**. v. 2, p. 179, 2007.

MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 35, p. 1301-5, 2003.

MADDEN, T. E.; CATON, J. G. Animal models for periodontal disease. **Methods Enzymol.** v. 235, p. 106-19, 1994.

MADIANOS, P.N.; BOBETSIS, Y.A.; KINANE, D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingival. **J ClinPeriodontol.** V. 32, n. 6, p. 57-71, 2005.

MCCARTHY, S.M.; BOVE, P.F.; MATTHEWS, D.E.; AKAIKE, T.; VLIET, A. Nitric oxide regulation of MMP-9 activation and its relationship to modifications of cysteine switch. **Biochemistry.** v. 47, p. 5832-5840, 2008.

MCKENNA, D. J.; JONES, K.; HUMPHREY, S.; HUGHES, K. Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. **Altern. Ther. Health Med.** v. 7, p. 93–100, 2001.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília, 2009.

MOLKOUWSKI, M. G.; GINEL, S. L.; SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M. The Productive Conformation of Arachidonic Acid Bound to Prostaglandin Synthase. **Science** **15.** v. 289, n. 5486, p. 1933-1937, 2000.

MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. **Nature.** v. 246, n. 5430, p. 217-9, 1973.

MORELLI, V.; NAQUIN, C. Alternative therapies for traditional disease states: menopause. **Am. Fam. Phys.** v. 66, p. 129–134, 2002.

NAKAMURA, H.; MORIYAMA, Y.; FUTAI, M.; OZAWA, H. Immunohistochemical localization of vacuolar H⁺-ATPase in osteoclasts of rat tibiae. **Arch Histol Cytol** v. 57, p. 535–9, 1994.

NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J. M.; BEHRINGER, R. R. The novel zinc finger containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell.** v. 108, p. 17-29, 2002.

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.

OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann Periodontol**. v. 1, n. 1, p. 821-78, 1996.

OFFENBACHER, S.; HEASMAN, P. A.; COLLINS, J. G. Modulation of Host PGE- 2 Secretion as a Determinant of Periodontal Disease Expression. **J Periodontol**. v. 64, n. 5, p. 432-44, 1993.

PAGE, R. C.; KORNMANN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: na introduction. **Periodontology**. v.14, p. 1997, 2004.

PAGE, R.; SCHROEDER, H. Structure and Pathogenesis, *In*: SHULUGER, S.; YOUDELIS, R.; PAGE, R.; HOHNSON, R. H. Periodontal Diseases. **Basic phenomena, clinical Management, and occlusal and restorative interrelationships**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger,. p. 183-220, 1990.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontal**. 2000, v. 24, p. 239-252, 2000.

PAQUETTE, G. R.; WILLIAMS, R. C. Rapid chairside diagnostic test for periodontitis: current status and critical assessment. **J Periodontol**. v. 15, p. 4-8, 1994.

PARK, S. Y.; PARK, J.; KIM, Y. H.; KIM, Y. H.; KIM, S. G.; SHON. K. J.; CHOI, Y. W.; LEE, S. J. Upregulation of heme oxygenase-1 via pi3k/akt and nrf-2 signaling pathways mediates the anti-inflammatory activity of schisandrin in porphyromonas gingivalis lps-stimulated macrophages. **Immunology Letters**. v. 139, p. 93– 101, 2011.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

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

REPONEN, P.; SAHLBERG, C.; MUNAUT, C.; THESLEFF, I.; TRYGGVASON, K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. **J Cell Biol**. v. 124, p. 1091–102, 1994.

ROBINSON, M.; HART.; PIGOTT, G. H. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. **Lab anim.** v. 25, n. 3, p. 247-53, july. 1991.

RODRIGUES, A. Z.; KAWATA, V. K. S.; JÚNIOR, A. B. N.; SOUSA, S. L. S.; GRISI, M. F. M.; PALIOTO, D. B.; JÚNIOR, M. T. Estratégias Terapêuticas e Potenciais Alvos Para Modulação da Resposta do Paciente Periodontal. **R. Periodontia.** v. 19, n. 1, 2009.

ROSSOMANDO, E. F.; WHITE, L. A novel method for the detection of TNF- alpha in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.** n. 64, p. 445-449, 1993.

ROVIN, S.; COSTICH, E.; GORDON, H. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J. Periodontol. Res.,** v. 44, p. 140, 1966.

SALLAY, K. Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. **Infect immun,** v. 43, n. 3, p. 1091-4, mar. 1984.

SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U. H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodont. Res.,** v. 17, p. 263-274, 1982.

SANDROS, J.; KARLSSON, C.; LAPPIN, D. F.; MADIANDOS, P. N.; KINANE, D. F.; PAPAPANOU, P. N. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. **J. Dent. Res.** v. 79, n. 10, p. 1808-1814, 2000.

SCHROEDER, H. E.; LINDHE, J. Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. **Arch. Oral. Biol.** v. 20, n. 775, 1975.

SELVIG, K. A. Discussion: animal models in reconstructive therapy. **J Periodontol** v. 65, n. 12, p. 1169-72, 1994.

SHAO, Y.; HARRIS, A.; WANG, M.; ZHANG, H.; CORDELL, G. A.; BOWMAN, M.; LEMMO, E. Triterpene glycosides from *Cimicifuga racemosa*. **Journal of Natural Products.** v. 63, n. 7, p. 905- 10, 2000.

SILVA, G. M.; COUTINHO, S. B.; PISCOYA, M. D. B. V.; XIMENES, R. A. A.; JAMELLI, S. R. Periodontitis as a Risk Factor for Preeclampsia. **J Periodontol.** v. 83, n. 11, p. 27-33, 2012.

SIMÕES, C. M. O. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul.** 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998.

SINGH, A.; MEHDI, A. A.; SRIVASTAVA, R. N.; VERMA, N. S. Immunoregulation of bone remodeling. **International Journal of Critical Illnesses and Injury Science**. v. 2, 2012

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; GOODSON, J. M.; LINDHE J. New concepts of destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol**. v. 11, p. 21–32, 1984.

SOMMER, C.; WHITE, F. - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: BEAULIEU P, LUSSIER D, PORRECA F et al. – **Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.**

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

STEPHEN, D.; DESJARDINS, P. The analgesic efficacy of valdecoxib vs oxycodone/acetaminophen after oral surgery. **Jada**. v. 133, p. 611-621, 2002.

TABA, J. R. M.; KINNEY, J.; KIM, A. S.; GIANNOBILE, W. V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. **Dent Clin North Am**. v. 49, n. 3, p. 551- 571, 2005.

TAT, S.K.; PELLETIER, J.P.; VELASCO, C.R.; ADRINES, M; MARTEL-PELLETIER, J. New perspectiva in osteoarthritis: the OPG and RANKL systems as a potential therapeutic target? **Keio J. Med**. V. 58, n. 1, p. 29-40, 2009.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**; 289:1504±8 2000.

TENG, Y. T. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. **Crit Rev Oral Biol Med**. v. 14, n. 4, p. 237-252, 2003.

TEZUKA, K.; NEMOTO, K.; TEZUKA, Y.; SATO, T.; IKEDA, Y.; KOBORI, M.; KAWASHIMA, H.; EGUCHI, H.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. **J Biol Chem**. v. 269, p. 15006–9, 1994.

TOKUNAGA, K.; SETO, H.; OHBA, H.; MIHARA, C.; HAMA, H.; HORIBE, M.; YONEDA, S.; NAGATA, T. Topical and intermitente application of parathyroid hormone recovers alveolar bone loss in rat experimental periodontitis. **J Periodont**. v. 46, p. 655-662, 2011.

UEBELHACK, R.; BLOHMER, J. U.; GRAUBAUM, H. J.; BUSCH, R.; GRUENWALD, J.; WERNECKE, K. D. Black cohosh and St. John's wort for climacteric complaints: a randomized trial. **Obstet. Gynecol.** v. 107, p. 247–255, 2006.

VÄÄNÄNEN, H. K.; ZHAO, H.; MULARI, M.; HALLEEN, J. M. The cell biology of osteoclast function. **J Cell Sci.** v. 113, p. 377–81, 2000.

VAL, D. R. Eficácia e segurança de *Tephrosia toxicaria* Pers. na artrite da articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos: Envolvimento do Óxido Nítrico, Hemeoxigenase-1 e Canais de potássio ATP-dependentes. 2012. 123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2012.

VANT'N, H. O. F. R. J.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Immunology.** v. 103, p. 255-261, 2001.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova [online].** v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

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.

WEI, S.; KITaura, H.; ZHOU, P.; ROSS, F.P.; TEITELBAUM, S.L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. **J. Clin. Invest.** V. 115, p. 282–290, 2005.

WUTTKE, W.; GORKOW C.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. **Menopause,** v.13, n.2, p.185- 96, 2006.

YOSHIE, H.; TAUBMAN, M. A.; OLSON, C. L.; EBERSOLE, J. L; SMITH, D. J. Periodontal bone loss and immune characteristics after adoptive transfer of Actinobacillus-sensitized T cells to rats. **Periodont Res.** v. 22, p. 499-505, 1987.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin.** v. 45, p. 27-37, 2007.