



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JURANDI NERY PEREIRA FILHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E
ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DA *Lippia*
thymoides NA PERIODONTITE**

Feira de Santana, BA
2019

JURANDI NERY PEREIRA FILHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E
ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DA *Lippia*
thymoides NA PERIODONTITE**

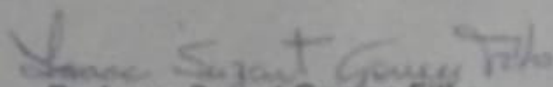
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profª Dra Soraya Castro Trindade

Co-orientadora: Profª. Dra. Angélica Lucchese

Feira de Santana
2019

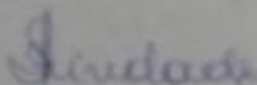
BANCA EXAMINADORA



Dr. Isaac Suzart Gomes Filho
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dr. Paulo Cirino de Carvalho Filho
(Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública)



Dr.^a Soraya Castro Trindade
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2019

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

P491

Pereira Filho, Jurandi Nery

Avaliação dos efeitos imunomodulador e antimicrobiano dos extratos da *Lippia thymoides* na periodontite / Jurandi Nery Pereira Filho. – 2019.

109 f.: il.

Orientadora: Soraya Castro Trindade.

Coorientadora: Angélica Maria Lucchese.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2019.

1. *Lippia thymoides* – extrato. 2. Periodontite – tratamento. 3. Imunomodulação. 4. Citocinas. I. Trindade, Soraya Castro, orient. II. Lucchese, Angélica Maria, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 616.314.17-008:615.28

Aos meus filhos, Rodrigo e Rafael.

Razão da minha luta.

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque sem ele nada seria possível.

Aos meus filhos, Rodrigo e Rafael pela compreensão.

Aos meus pais, Jurandi e Maria Helena por serem meu porto seguro nas horas mais difíceis.

Aos amigos e familiares, principalmente meu irmão Julimar, pela nobreza e apoio incondicional.

À UEFS e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelo apoio necessário

À minha orientadora Prof^a Soraya por acreditar em mim e por todo incentivo e aprendizado ao longo do caminho.

Ao NUPPIIM pela infraestrutura e incentivo

Ao LAPRON, principalmente a minha co-orientadora Prof^a Angélica, Acsa e Ingrid pela gentileza e prestatividade.

Aos colegas do laboratório, Antônio, Laerte, Rebeca, Thaís e Deyvison (nosso Macgyver) pelos momentos de alegria e dificuldade que passamos juntos (a luta foi árdua).

Aos alunos da graduação pelo suporte logístico.

À Danusa pela colaboração, apoio e incentivo.

E aos voluntários da pesquisa pela prestatividade e confiança.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, cujo fator etiológico primário constitui-se na presença de biofilme na superfície dentária, tendo a resposta do hospedeiro um papel preponderante no seu início e desenvolvimento. Seu tratamento tem como princípio a remoção mecânica do biofilme. O uso de adjuvantes químicos para o controle do biofilme e conseqüentemente da periodontite também tem sido preconizado em diversas formas de administração, porém a utilização de fitoterápicos para este propósito é bastante restrita. A *Lippia thymoides* é uma planta muito conhecida e utilizada na medicina popular, cujo potencial antibacteriano vem sendo estudado. Esse trabalho avaliou a atividade imunomoduladora e antimicrobiana dos extratos dessa planta através do cultivo do sangue total de voluntários com e sem periodontite da Clínica de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A toxicidade do extrato metanólico de *Lippia thymoides* foi testada em *Artemia salina* e por meio da redução do MTT [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)], em células do sangue periférico humanas. Foi realizado o teste de difusão em disco e de concentração inibitória mínima para os ensaios antimicrobianos. As células do sangue periférico dos participantes foram cultivadas por 48h em presença dos extratos e os níveis das citocinas interleucina 17(IL-17), interferon gama (IFN- γ), interleucina 13(IL-13), interleucina 10(IL-10) e interleucina 1 beta(IL-1 β) foram dosados por meio de ensaio imunoenzimático. O extrato das folhas de *Lippia thymoides* diluído em metanol (50%) e dimetilsulfóxido(DMSO) 3% não apresentou efeito citotóxico para células mononucleares do sangue periférico humanas nas concentrações de 1%, 5% e 10%. O extrato metanólico da *L. thymoides* inibiu a produção de IL-13 (p=0,000) e induziu maior produção de IFN- γ (p=0,019) quando comparado com a ausência de estímulo. Quando empregado concomitantemente com o extrato de *P. gingivalis*, levou à redução dos níveis de IL-1 β (p=0,000) e IL-13 (p=0,000) em relação àqueles observados quando o extrato bacteriano fora empregado isoladamente. Além disso, o extrato da *L. thymoides* se mostrou bactericida para os microrganismos *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, bacteriostático para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*, fungicida para *Candida glabrata* e fungistático para *Candida albicans*. O extrato metanólico de *Lippia thymoides* mostrou efeito antibacteriano,

antifúngico e imunomodulador, sendo um potencial produto biotecnológico para o controle de doenças bucais, especialmente a periodontite.

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia thymoides*, citocinas, imunomodulação, extratos

ABSTRACT

Periodontitis is a disease of multifactorial etiology, whose primary etiological factor is the presence of biofilm on the dental surface, and the host response plays a major role in its onset and development. Its treatment has as its principle the mechanical removal of the biofilm. The use of chemical adjuvants to control biofilm and consequently periodontitis has also been advocated in various forms of administration, but the use of herbal medicines for this purpose is quite restricted. *Lippia thymoides* is a plant well known and used in folk medicine, whose antibacterial potential has been studied. This work evaluated the immunomodulatory and antimicrobial activity of the extracts of this plant through the cultivation of whole blood of volunteers with and without periodontitis of the Dental Clinic of Feira de Santana State University (UEFS). The toxicity of *Lippia thymoides* methanolic extract was tested in *Artemia salina* and by reducing MTT [3-(4,5-dimethylazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] in human peripheral blood cells. Disc diffusion and minimum inhibitory concentration tests were performed for antimicrobial assays. Participants' peripheral blood cells were cultured for 48h in the presence of extracts and levels of interleukin 17 (IL-17), interferon gamma (IFN- γ), interleukin 13 (IL-13), interleukin 10 (IL-10) cytokines.) and interleukin 1 beta (IL-1 β) were dosed by enzyme immunoassay. *Lippia thymoides* leaf extract diluted in methanol (50%) and dimethylsulfoxide (DMSO) 3% had no cytotoxic effect on human peripheral blood mononuclear cells at concentrations of 1%, 5% and 10%. *L. thymoides* methanolic extract inhibited IL-13 production ($p = 0.000$) and induced higher IFN- γ production ($p = 0.019$) when compared to the absence of stimulation. When used concomitantly with *P. gingivalis* extract, it led to a reduction in IL-1 β ($p = 0.000$) and IL-13 ($p = 0.000$) levels compared to those observed when the bacterial extract was used alone. In addition, *L. thymoides* extract was bactericidal for the microorganisms *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*, bacteriostatic for *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella choleraesuis*, fungicide for *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *Lippia thymoides*. Methanolic extract showed antibacterial, antifungal and immunomodulatory effects, being a potential biotechnological product for the control of oral diseases, especially periodontitis.

KEYWORDS: *Lippia thymoides*, cytokines, extracts, immunomodulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exsicata de <i>L. thymoides</i> Mart & Schauer. Nº 241404– Herbário, UEFS	34
Figura 2: Citotoxicidade DMSO	43
Figura 3: Citotoxicidade Etanol	43
Figura 4: Controle	44
Figura 5: Curva de diluição do extrato das folhas de <i>Lippia thymoides</i> para dosagem de proteínas por comparação com curva padrão de albumina sérica bovina (método de Lowry modificado)	45
Figura 6: Efeito citotóxico das células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Avaliação da viabilidade celular de CMSP, durante 48h à 37°C e 5% de CO ₂ pela técnica do MTT-tetrazólio [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)]. P < 0,05. Teste One-way ANOVA.	46
Figura 7: Concentração de IL 1 β no sobrenadante do sangue total de voluntários com periodontite e sem periodontite	47
Figura 8: Concentração de IL 13 no sobrenadante do sangue total de voluntários com periodontite e sem periodontite	48
Figura 9: Concentração de IL 10 no sobrenadante do sangue total de voluntários com periodontite e sem periodontite	48
Figura 10: Gráficos comparativos entre as citocinas: IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ	50
Figura 11: Alos de inibição da <i>L. thymoides</i> : (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Salmonella choleraesuis</i> , (C) <i>Micrococcus luteus</i> , (D) <i>Candida albicans</i> , (E) <i>Staphylococcus aureus</i> , (F) <i>Bacillus subtilis</i> (G) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (H) <i>Candida glabrata</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das características clínicas entre os grupos	41
Tabela 2: Halos de inibição das espécies de bactérias pelo extrato metanólico das folhas de <i>Lippia thymoides</i> Mart. & Schauer, obtidos com o teste de difusão em disco realizado em 24h	52
Tabela 3: Halos de inibição das espécies de fungos pelo extrato metanólico das folhas de <i>Lippia thymoides</i> Mart. & Schauer, obtidos com o teste de difusão em disco realizado em 48h	52
Tabela 4: Ensaio da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e o efeito inibitório do extrato metanólico de <i>Lippia thymoides</i> avaliadas 24h para bactérias e 48h para fungos.	53

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAP	Associação Americana de Periodontia
ATCC	“American Type Culture Collection” – Banco de Coleção de Culturas Americanas
CDC	Centro para o Controle de Doenças
CCT	Coleção de Culturas Tropical, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas - SP, Brazil.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFP	Federação Europeia de Periodontia
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1, beta
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
KD	Quilodálon
LAPRON	Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos

LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MCSF	Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MMP-1	Matriz de metaloproteinase 1
MTT -tetrazólio	[3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)]
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIC	Nível de inserção clínica
NK	“Natural killer” – Células assassinas naturais
OPG	Osteoprotegerina
P	Periodontite
PG	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PWN	Pokeweed
PS	Profundidade de sondagem
R	Resistente
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B Ligante

SA	Sem atividade
SP	Sem periodontite
SS	Sangramento à sondagem
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 PERIODONTITE	19
2.2 CITOCINAS	22
2.3 O GÊNERO <i>Lippia</i>	26
2.3.1 <i>Lippia thymoides</i>	28
2.4 A MICROBIOTA BUCAL	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	33
3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA	34
3.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA	34
3.4 CULTURA DE CÉLULAS	35
3.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE	36
3.5.1 Ensaio Toxicológico em Artêmia Salina	36
3.5.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT	36
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	37
3.6.1 Difusão em Disco	37
3.6.2 Concentração Mínima Inibitoria (MIC)	38
3.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS	38
3.8 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE DADOS	39
3.9 ASPECTOS ÉTICOS	39
4 RESULTADOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS	39
4.2 TESTE DE CITOXICIDADE EM ARTEMIA SALINA	42
4.3 DOSAGEM DE PROTEÍNA	44
4.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	45
4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS	46

4.5.1 Comparação entre os Estímulos Empregados na Cultura Celular	49
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	51
4.6.1 Teste de Difusão em Disco	51
4.6.2 Ensaio da Concentração Mínima Inibitória	51
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS	62
8 APÊNDICES	81
9 ANEXO - PARECER CONSUBSTANCIADO	105

1.INTRODUÇÃO

A periodontite é uma das afecções mais comuns na cavidade bucal, resultado do desequilíbrio entre a microbiota presente no biofilme dental e a resposta do hospedeiro (TRINDADE et al., 2013). Tem como consequência principal a perda do elemento dental, levando a problemas estéticos, funcionais, fonéticos e emocionais (LINDHE, 2005). Além disso, já foram relatados problemas de ordem sistêmica relacionados à doença periodontal como acidente vascular cerebral (DIAS et al 2007), doenças cardiovasculares e infecções pulmonares (MACÊDO et al. 2010; GOMES-FILHO et al., 2014).

O tratamento de escolha para a periodontite é a mecânica de raspagem e alisamento radicular para controle do biofilme bacteriano e seus produtos nocivos aos tecidos do hospedeiro, muitas vezes auxiliada pelo uso de antimicrobianos sistêmicos como a amoxicilina e o metronidazol ou na forma de bochechos, a exemplo do digluconato de clorexidina a 0,12%. Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos é cada vez maior o número de microrganismos, com cepas resistentes a esses medicamentos. Algumas substâncias utilizadas como antimicrobianos em colutórios e dentifrícios, como o triclosan, além de contribuir para a seleção de bactérias resistentes, podem causar danos a animais, a água utilizada na agricultura e a ambientes marinhos (CORTEZ, 2011).

Por causa do aumento dessa resistência, é necessário produzir medicamentos cada vez mais potentes e conseqüentemente mais caros para ultrapassar as barreiras de defesa desses microrganismos. Além disso, muitas pessoas não têm acesso a tratamento dentário na qualidade e frequência necessárias para uma boa saúde e fazem uso de plantas medicinais, principalmente na forma de chás, no tratamento das afecções bucais (SILVA, 1995). Diante deste panorama, tem-se buscado abordagens alternativas para a prevenção e controle das doenças bucais.

Assim, já que o Brasil possui uma grande biodiversidade, tendo a mais rica flora do mundo com várias espécies com potencial biotecnológico (HEINZMANN & BARROS, 2007; OCAZIONES 2010), é natural que se procure em nosso meio ambiente produtos que beneficiem a população a custos mais baixos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora e antimicrobiana dos extratos da *Lippia thymoides*, uma planta muito conhecida na medicina popular que tem se mostrado promissora para a obtenção de produtos biotecnológicos (SILVA et

al., 2015; OLIVEIRA, 2014), através da indução ou inibição de citocinas no sangue total humano *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERIODONTITE

As doenças periodontais estão entre as infecções orais mais comuns no mundo. Estão associadas ao estabelecimento de um biofilme disbiótico que desencadeia uma resposta inflamatória e imunológica no hospedeiro, podendo levar à destruição dos tecidos de suporte e eventual perda dentária (MEYLE & CHAPPLE, 2015; HAJISHENGALLIS, 2014; TRINDADE, et al., 2013; EKE, et al., 2012). Além do substancial ônus econômico e impacto negativo dessas doenças na qualidade de vida (BATCHELOR, 2014; DURHAM et al. 2013), bactérias orais e infecções periodontais têm sido indicados como potenciais fatores de risco para várias doenças sistêmicas (MIRANDA, et al., 2019; TAYLOR & HENNEKENS, 2018; GOMES-FILHO, et al., 2014).

Segundo a nova classificação da Academia Americana de Periodontia (AAP) e Federação Europeia de Periodontia (EFP) a periodontite é uma doença inflamatória crônica que compromete a integridade dos tecidos de sustentação do dente, isto é, a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar, conhecidos coletivamente como periodonto. Para o diagnóstico de periodontite tem que haver perda de inserção clínica interdental detectável em ≥ 2 dentes não adjacentes, ou perda de inserção vestibular ou lingual ≥ 3 mm com bolsa ≥ 3 mm detectável em ≥ 2 dentes, mas a perda de inserção observada não ser atribuído a causas não relacionadas à periodontite (PAPAPANOU, et al., 2018). Além disso a nova classificação tornou a periodontite crônica e a periodontite severa uma entidade única, conhecida apenas como periodontite, mas com manifestações diferentes. Conhecida desde a antiguidade, a periodontite tornou-se prevalente após a domesticação de plantas e animais nas sociedades neolíticas (aproximadamente 10.000 anos atrás), quando a microbiota bucal sofreu uma mudança de composição distinta com aumento na frequência de microrganismos como *Porphyromonas gingivalis* e outras espécies associadas, em comparação com sociedades anteriores de catadores e caçadores (ADLER, et al. 2013).

A periodontite é a doença inflamatória mais prevalente em todo o mundo (CHAPPLE & GENCO 2013), afetando globalmente quase 50% da população adulta e 60% da população idosa. Entretanto, embora a perda de inserção clínica esteja relacionada com a idade (BILLINGS et al., 2018), parece não ser dependente apenas da idade, mas sim do tempo em que o organismo é exposto ao desafio bacteriano (PAPAPANOU, et al., 2018; HINRICHS & NOVAK, 2011).

Balaji, et al. (2018), em um estudo com a população do sul da Índia, encontraram uma alta prevalência de doença periodontal na população estudada (42,3%). Entre os participantes urbanos, os escores de idade, tabagismo, mastigação de pastilhas, dentes cariados, ausentes e restaurados, mostraram-se significativamente associados à periodontite ($P < 0,05$). E concluíram que a prevalência de periodontite parece ser alta mesmo em áreas com acesso adequado a cuidados com a saúde bucal e existe um risco de sobrecarga inflamatória de maneira definitiva.

Chigasaki, et al. (2018), em um estudo transversal de larga escala, examinaram o estado periodontal e a prevalência de bactérias do “complexo vermelho” (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*) em adultos japoneses em um total de 977 participantes inscritos no estudo. O valor médio de nível de crista óssea e a porcentagem de locais com uma profundidade de sondagem ≥ 4 mm ou a presença de sangramento à sondagem foram significativamente maiores em participantes mais velhos. As taxas de detecção de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* foram 46,3%, 76,4% e 61,1%, respectivamente. A taxa de detecção de *P. gingivalis* aumentou significativamente com idade, enquanto que as de *T. denticola* e *T. forsythia* foram comparativamente altas para todos os grupos etários.. Os fumantes atuais exibiram condição de doença mais avançada e uma significativamente maior taxa de detecção de *P. gingivalis* do que os não fumantes. Assim, eles concluíram que a condição periodontal piora com idade, e *P. gingivalis* parece ser a bactéria do complexo vermelho mais intimamente associada à periodontite.

Discordâncias no diagnóstico das doenças periodontais podem ser algumas das razões pelas quais a prevalência de gengivite e periodontite pode variar muito, dependendo de qual nível de referência é considerado como critério para classificar a doença (Hujuel 2011). A classificação proposta pela Academia Americana de

Periodontia (AAP), citada acima, é voltada para o diagnóstico clínico, e não se mostra bem indicada para estudos de base populacional, que tenham como objetivo a observação da prevalência das doenças periodontais. Para este fim, a própria AAP, juntamente com o Centro para o Controle de Doenças (CDC), preconizam o critério proposto por Page e Eke (2007), atualizado por Eke (2012). Entretanto, para estudos de associação e experimentos que envolvam a etiopatogênese da doença, é necessário que testes mais específicos, com menor chance de que resultados falso-positivos sejam encontrados, a exemplo dos critérios preconizados por Gomes-Filho et al. (2007) e Gomes-Filho, (2018).

No tocante à etiologia, um grupo de três bactérias anaeróbicas orais que compreende *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* tem sido tradicionalmente considerado como agente causador da periodontite, com base em suas propriedades de virulência e forte associação com sítios doentes (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Entretanto, avanços recentes de estudos metagenômicos, metatranscriptômicos e mecanicistas (BALAJI, et al., 2019; MERCADO, et al., 2019; SOLBIATI & FRIAS-LOPEZ, 2018) são consistentes com um novo modelo de patogênese da doença periodontal, que sugere uma microbiota associada à periodontite mais diversa do que se pensava anteriormente está envolvida na doença. Nesse modelo, a doença resulta não de patógenos individuais, mas da sinergia polimicrobiana e disbiose, o que perturba o biofilme ecologicamente equilibrado associado à homeostase do tecido periodontal (ROSIER, et al., 2014; HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012; DARVEAU, 2010). A disbiose da microbiota periodontal significa um desequilíbrio na abundância relativa ou influência de espécies microbianas, que medeiam papéis distintos e sinergizam para formar uma entidade patogênica que pode causar doença em tecidos orais ou extra-orais de indivíduos suscetíveis (ABUSLEME et al., 2013; HAN & WANG, 2013; KEBSCHULL, et al., 2010).

Segundo Banjar & Alshammari (2014), a periodontite resulta da interação entre microbiota, fatores ambientais, imunológicos e genéticos destacando o papel das citocinas, que são liberadas em sítios de periodontite em resposta a presença de microrganismos e seus fatores de virulência colaborando na reabsorção e destruição do tecido conjuntivo. Esses autores destacam o papel do polimorfismo genético das interleucinas na patogênese da periodontite, contudo esse papel é amplamente obscurecido. Estudos indicam que as variações genéticas de IL-1 α , IL-1 β , IL-1RN, IL-

6 e IL-10 são significativamente associadas à periodontite (KARIMBUX, et al., 2012; LAINE, et al., 2012).

Para Hajishengallis (2015), as principais descobertas da pesquisa básica precisam ser traduzidas em aplicações clínicas para terapias de modulação do hospedeiro para neutralizar os mecanismos imuno-subversivos dos microrganismos periodontais e, assim, contribuir para o tratamento da periodontite e distúrbios inflamatórios sistêmicos associados. Essas estratégias de modulação do hospedeiro têm maior probabilidade de sucesso do que abordagens antimicrobianas diretas, já que podem agir com baixa abundância especialmente quando se trata de patógenos fundamentais, pois estes provavelmente não serão completamente erradicados, em parte porque podem se esconder dentro de células hospedeiras permissivas.

Pelo exposto, a periodontite é uma doença que apesar de ser conhecida há muito tempo ainda carece de mais estudos sobre sua etiopatogenia, diagnóstico e forma de tratamento visto sua importância para a saúde e bem estar da população mundial.

2.2 CITOCINAS

Citocinas são moléculas proteicas secretadas pelas células do sistema imune inato e adaptativo que podem regular diversas funções na resposta imune. Enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (MOULTON, 2016). Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica (VARELLA & FORTE, 2001).

Segundo Shebert (2011) As citocinas formam um grupo de proteínas que participam da sinalização celular, da comunicação intercelular e de muitas funções celulares e imunológicas. Elas estão proeminentemente envolvidas em respostas inflamatórias e defesa contra infecções.

Podem ser produzidas por vários tipos celulares entretanto sua distinção em perfis se dá pela seguinte via: há uma diferenciação inicial das células T pela expressão de um marcador de superfície celular, podendo ser CD4 ou CD8. As células T que expressam o marcador CD4, são chamadas de células T CD4+e podem se

diferenciar em subtipos distintos. Contudo, estes linfócitos T CD4+ são coletivamente chamados de linfócitos T auxiliares (TH), ao menos até a sua diferenciação em subtipo específico (ABBAS, et al., 2015)

As células efectoras da linhagem CD4+ são caracterizadas pela sua capacidade de expressar moléculas de superfície e secretar citocinas que ativam outras células (MURPHY, et al, 2016). Enquanto as células T CD4+ virgens produzem IL-2 principalmente seguindo sua ativação, as células efectoras são capazes de produzir um grande número e uma variedade de citocinas que possuem atividades biológicas diversificadas. Existem 3 subtipos distintos de células T CD4+ chamados TH1, TH2 e TH17, que funcionam na defesa do hospedeiro contra diferentes tipos de agentes infecciosos e estão envolvidos em tipos diferentes de lesão ao tecido nas patologias imunomediadas (ABBAS, et al., 2017).

Na periodontite, uma alteração no equilíbrio entre respostas Th1 e Th2, e a ativação da Th17, modulam a expressão da doença, levando à inflamação e induzindo perda óssea (PRESHAW & TAYLOR, 2011). A resposta Th1 desencadeia predominantemente uma resposta imune celular através principalmente da secreção de citocinas IL-2, IL-12 e IFN- γ . A resposta Th2 é considerada uma resposta imune humoral onde ocorre principalmente a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL10 e IL-31(GAFFEN & HAJISHENGALLIS, 2008).

Na periodontite, as principais citocinas envolvidas são a IL 10, IL 1 β , IL 6, INF- γ , TNF- α , IL 8, IL 13, IL 17 e IL 23. (CARDOSO, et al., 2018; FERREIRA, et al., 2017; FIGUEREDO, et al., 2017). Em nosso estudo avaliamos os níveis de, IL 1- β , IL 10, INF- γ , IL 13 e IL 17.

Interleucina 1 beta (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória, expressa por uma miríade de células, incluindo macrófagos, células NK, monócitos, células dendríticas e neutrófilos. Hipersensibilidade inflamatória foi encontrada como sendo o resultado de ativação de IL-1 β na ciclo-oxigenase-2 (PTGS2 / COX2). IL-1 beta, também tem sido associada com choque séptico, e cicatrização de feridas (GIRALDO et al., 2009). IL-1 β , é uma das formas moleculares de IL-1, e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (FERRERO-MILANI et al., 2006). O mecanismo de inibição natural dessa citocina envolve o bloqueio da ligação no receptor por antagonistas de receptores de citocinas, assim como o IL-1Ra, antagonista do receptor de IL-1. IL-1Ra é uma proteína da família das interleucinas

originalmente descrita como uma molécula secretada por monócitos e macrófagos, que modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas à IL-1 (ARENDA & GUTHRIDGE, 2000). Patógenos periodontais, como *Porphyromonas gingivalis*, possuem moléculas capazes de induzir o aumento na sua produção (ALMEIDA-DA-SILVA, et al., 2019; LINHARTOVA et al., 2019; TRINDADE et al., 2012).

A interleucina 10 (IL-10) é uma potente citocina anti-inflamatória que desempenha um papel crucial e muitas vezes essencial na prevenção de patologias inflamatórias e auto-imunes (MOSSER & ZANG 2008; MOORE et al, 2001;). É um inibidor de macrófagos ativados, o que lhe cabe um importante papel no controle homeostático das reações da imunidade inata e da imunidade celular. Tem a função de inibir a produção de IL-12 e TNF pelos macrófagos ativados, inibir a expressão de co-estimuladores e das moléculas do MHC de classe II nos macrófagos, e estimular a proliferação de células B humanas em cultura (ABBAS et al., 2015). Deficiência ou expressão aberrante de IL-10 pode aumentar a resposta inflamatória ao desafio microbiano, mas também levar ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal e um número de doenças auto-imunes (O'GARRA et al., 2008). Também parece ser modulada por microrganismos associados à patogênese da periodontite (TOKER, et al., 2019; TRINDADE et al., 2012).

Interferon gama (INF- γ) é uma citocina produzida primariamente pelas células Th1, embora ela possa também ser produzida pelas células Tc e NK em uma extensão menor. Ela tem numerosas funções tanto no sistema imune inato como no adaptativo tais como: ativação de monócitos, ativação de células endoteliais e aumento de MHC I e II em muitas células de tecidos especialmente macrófagos (MAYER, 2009). É uma citocina imunorreguladora que, quando ativada por seu receptor, desempenha um papel importante na ativação de processos inflamatórios, que são a base da doença periodontal (FIORILLO et al., 2018). O IFN- γ é uma proteína homodimérica que pertence às citocinas do tipo II. O seu receptor é constituído por duas cadeias polipeptídicas, pertencentes à mesma família do IFN- γ e denominadas IFNGR1 e IFNGR2. A ligação do IFN- γ com as duas cadeias induz a sua dimerização, o que causa uma associação entre as JAK1 e as JAK2-quinases, ativando a via de sinalização JAK / STAT. Essa via de sinalização leva à ativação do fator de transcrição STAT1, que induz a transcrição de vários genes, incluindo o próprio IFN- γ , que ativa

macrófagos para matar os microrganismos fagocitados junto com a ligação CD40L-CD40; além disso, o IFN gama promove a diferenciação em Th1 ativando o fator de transcrição T-bet e inibindo-o em direção a Th2 (ABBAS et al., 2015). Estudos sublinharam as evidências clínicas entre os interferons no fluido crevicular e a resposta inflamatória da periodontite (NIEDZIELSKA & CIERPKA, 2010).

A interleucina-13 (IL 13) é uma citocina de 15 kD, com quatro α -hélices, produzida por diferentes tipos celulares. Ela imita os efeitos da IL-4 em células não-linfóides. As ações da IL-13 na célula endotelial, as quais incluem indução da molécula 1 de adesão à célula vascular e a produção de quimiocinas, podem contribuir para o recrutamento de eosinófilos nos tecidos durante as reações imunes mediadas por células Th2 (ABBAS et al., 2015). A IL-13 está intimamente relacionada à IL-4 na função biológica, mas, em geral, as respostas das células à IL-13 são menores em magnitude. A exceção é a diferenciação de células Th2, na qual a IL-13 não parece desempenhar um papel porque as células Th0 não expressam IL-13R em suas superfícies. No entanto, como a IL-4, a IL-13 inibe a produção de macrófagos de TNF, IL-1 β e quimiocinas pró-inflamatórias, mas pode regular positivamente a síntese de IL-12 por células dendríticas e macrófagos (TAK & SAUNDERS, 2006). A ativação de células B na presença de IL-13 estimula a sua proliferação e induz o aumento da expressão na superfície de CD23, MHC de classe II e IgM. A IL-13 também promove a mudança do isotipo para IgE e IgG1, e os camundongos IL-4 - / - ainda são capazes de produzir quantidades modestas desses anticorpos usando a via dependente da IL-13. Células T CD4 + maduras de camundongos IL-13 - / - produzem níveis significativamente mais baixos das citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-10. Estes animais também possuem níveis basais mais baixos de IgE sérica. Estudos de infecções por nematóides de camundongos STAT6 - / -, IL-4R α - / - e IL-13 - / - mostraram que a sinalização da IL-13 é absolutamente necessária para a defesa contra esses parasitas. Estudos de células T estimuladas por antígenos tratadas com anticorpos anti-IL-13 sugeriram que a inibição da função de IL-13 pode comprometer a expressão de IL-4 (O'SHEA et al., 2013). A IL-13 induz tanto a regulação de TGF- β , uma citocina conhecida por estimular a produção de colágeno e por infra-regulação da produção de MMP-1 colágeno-destruidora. Este efeito pode ser forte durante a periodontite quando as células Th2 assistem as células T (BEKLEN, 2017).

Estudos têm evidenciado o subtipo celular conhecido como Th17, relacionado com a produção de IL-17, a princípio envolvida com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (BETELLI et al., 2008; OUKKA, 2007; SCHMIDTWEBER, et al., 2007). A IL-17 aumenta a produção de múltiplos mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6 e TNF- α . Diversos estudos apontam que a resposta Th17 esteja presente na resposta inicial a diversos patógenos. Em relação à periodontite, uma elevação significativa da quantidade total de IL-17 foi demonstrada no fluido crevicular gengival, amostras de fluidos e sobrenadantes de cultura de células gengivais em pacientes com periodontite em comparação com controles saudáveis o que sugeriu um papel para a IL17 na patogênese da periodontite (VERNAL et al, 2005). O envolvimento da IL-17 na resposta do hospedeiro doença periodontal é ainda apoiado por Lester et al.(2007), que relataram aumento da concentração de IL-17 em sobrenadantes de tecido gengival em locais com perda de inserção clínica moderada a grave e encontrou uma correlação entre eles baseada no nível dos sítios. Arief et al (2017), encontrou níveis de concentração sérica de IL-17 significativamente maiores ($p = 0,026$) em indivíduos com periodontite crônica 3,6 (1,03) pg / mL em relação ao controle Contudo, Pradeep et al (2009) encontraram resultados incertos em relação à IL-17 e periodontite. Apesar do papel da IL-17 na inflamação ter sido estudado por um bom número de investigadores, ainda não está claro e pouca evidência tem sido encontrada em relação ao nível sérico de mediadores inflamatórios da IL-17 em pacientes com periodontite.

2.3 O GÊNERO *Lippia*

O uso de espécies vegetais com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de vários povos, constituindo, ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação (GOMES, et al. 2011; SANTOS, et al., 2008).

Entre as plantas utilizadas como medicinais, destacam-se as espécies da Família Verbenaceae pertencente à ordem Lamiales. Esta Família compreende 35 gêneros e 1.035 espécies, muitos exclusivamente brasileiros, com distribuição tropical e subtropical (CARDOSO, et al., 2018). Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (JUDD, et al., 2008).

O gênero *Lippia* é o segundo maior da família Verbenaceae e possui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em territórios da África tropical (TERBLANCHÉ & KORNELIUS, 1996; PASCUAL et al. 2001)

Os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* estão localizados no México e Brasil, sendo que o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, que se estende pelos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (OLIVEIRA, et al., 2007).

No Brasil, encontram-se aproximadamente 120 espécies de *Lippia*, distribuídas no cerrado e caatinga, onde se destacam por seu aspecto chamativo no período da floração e por seu aroma forte e geralmente agradável. Destas espécies, a *L. alba* (Mill.) N. E. Brown (erva cidreira ou falsa melissa) é a mais conhecida e utilizada devido as suas propriedades medicinais (OLIVEIRA, et al., 2006).

No nordeste do país muitas espécies de *Lippia* são usadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, dores estomacais, espasmos, bronquites e tosse. Em muitos casos, as partes usadas são as folhas e flores na forma de infusão ou decocto administradas oralmente ou através de emplastos (PASCUAL, et al., 2001; OLIVEIRA, et al., 2006).

Várias espécies de *Lippia* são empregadas na medicina tradicional no tratamento de doenças diversas e, como resultado, muitas têm sido investigadas do ponto de vista farmacológico, revelando importantes propriedades tais como: ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, antifúngica, antiinflamatória e antipirética de *L. alba* (Mill.) N. E. Brown (CORDERO, et al, 2017; MESA-ARANGO, et al. 2009; GOMES, et al, 1993); efeito antisséptico, antiinflamatório e cicatrizante do extrato aquoso de *L. sidoides* Cham (GOMES, et al. 2011); ação contra a malária, no tratamento de hipertensão e combate à sarna de *L. multiflora* Moldenke (VALENTIN, et al. 1995; OLADIMEJI, et al. 2000) e tratamento da tosse e bronquite de *L. dulcis* Trevir (COMPADRE, et al 1986).

O efeito antibacteriano de espécies de *Lippia* tem sido relatado na literatura. *L. alba* e *L. sidoides* apresentaram ação contra o *Mycobacterium tuberculosis* (Mota et al. 2018).

Juiz (2013), estudou a atividade antimicrobiana das plantas *Ocimum americanum* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha x villosa* Huds, *Chenopodium ambrosioides* L. e *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. frente aos periodontopatógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*. Os resultados mostraram que os óleos essenciais das plantas estudadas foram mais efetivos em inibir o crescimento dos microorganismos que os extratos metanólicos

Além da ação antimicrobiana relatada, Ríos et al (2017), provaram que a mistura dos óleos essenciais da *L. origanoides* e *S. glutinosa* causou uma alta taxa de mortalidade contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Interessantemente, o óleo essencial da *L. origanoides* rico em timol, aumentou a proliferação de células tronco do tecido adiposo *in vitro* Brito et al (2018).

Algumas espécies de *Lippia* têm sido utilizadas também no reflorestamento de áreas devastadas pela mineração. *Lippia origanoides*, por exemplo, tem sido usada como espécie pioneira em regiões de minas de ferro desativadas ou abandonadas na Venezuela (GUEVARA et al, 2005).

2.3.1 *Lippia thymoides*

A espécie *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, conhecida popularmente como alecrim-do-mato, alecrim-de-vaqueiro ou alecrim-miúdo-de-cheiro, tem despertado o interesse de pesquisadores (SILVA et al., 2015; OLIVEIRA, 2014), por ser promissora para a indústria farmacêutica e de defensivos. Corresponde a uma espécie nativa e endêmica do Brasil, podendo ser encontrada principalmente na Bahia e Minas Gerais, em domínios fitogeográficos de caatinga e cerrado, sendo listada no banco de dados de plantas do Nordeste (SALIMENA, 2010; GAMARRA-ROJAS et al., 2012).

Além disso, a atividade antimicrobiana de seus óleos essenciais e extratos tem sido demonstrada por meio de testes qualitativos (RODRIGUES et al., 2008) e quantitativos (OLIVEIRA et al., 2011). Silva (2012), demonstrou que os óleos essenciais dessa planta inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto as frações diclorometano e acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e caules inibiram o crescimento de *S. aureus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. O extrato metanólico das folhas significativamente reduziu a temperatura retal

de ratos submetidos ao ensaio de hipertermia induzida por hiperpirexia com injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Lucchese et al. (2006) e Pinto et al. (2006) relataram que o óleo essencial das folhas apresentou atividade antimicrobiana contra o *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*.

O óleo essencial dessa espécie apresentou atividade antinociceptiva em camundongos, provavelmente pelo efeito anti-inflamatório do β -cariofileno, 1,8-cineol, canfeno e borneol (SILVA, 2012). Lopes et al. (2005) e Lopes (2004) isolaram do óleo essencial dessa planta, os compostos timol, carvacrol, cineol e humuleno.

Pelo exposto, observa-se que o uso de princípios ativos encontrados nos extratos e óleo essencial da *L. thymoides* vem ganhando espaço no cenário da biotecnologia. Assim, este trabalho visa colaborar nesse sentido testando a capacidade imunomoduladora e antimicrobiana dessa planta no controle da periodontite.

2.4 A MICROBIOTA BUCAL

A descoberta dos microrganismos remonta ao século XVI. Historicamente, Antonie van Leeuwenhoek examinou o seu próprio biofilme dentário e de outras pessoas através de seu microscópio. Ele nomeou os micróbios “Dierken”, significando pequenos objetos vivos (GORDON & KLAENHAMMER, 2011). Desde então, a ciência vem tentando descobrir os segredos dos microrganismos. Nos últimos 200 anos, com os avanços da microscopia e de outras tecnologias, a compreensão dos microrganismos tornou-se cada vez mais profunda. A cavidade oral humana contém vários habitats diferentes, incluindo os dentes, o sulco gengival, a língua, os palatos duro e mole e as amígdalas, e atua como o tubo que conecta o exterior e o trato digestivo e o trato respiratório do corpo humano, espaço apropriado para a colonização de microrganismos (GAO, et al., 2018).

Os microrganismos encontrados na cavidade oral humana têm sido referidos como microbiota bucal, microbiota oral ou microbioma oral (DEWHIRST et al., 2010). A interação de microrganismos orais variáveis ajuda o corpo humano contra a invasão da estimulação indesejável do lado de fora. No entanto, o desequilíbrio dessa microbiota contribui para doenças orais, como cárie dentária, periodontite (PHILIP et

al., 2018; WASFI et al., 2018; COSTALONGA & HERZBERG, 2014; JORTH et al., 2014; LIU et al., 2012;), doenças da mucosa oral (SAIKALY, 2018) e doenças sistêmicas, como doenças sistêmicas gastrointestinais e nervosas (LIRAJUNIOR & BOSTRÖM, 2018; PLAZA-DIAZ et al., 2018; REDDY et al., 2018; ATARASHI, 2017; BLOD et al., 2017; PETERS et al., 2017; ROSZYK & PUSZCZEWICZ, 2017; LING et al., 2015; JORTH et al., 2014; KUCZYNSKI et al., 2012; ZARCO et al., 2012), cardiovasculares e respiratórias (TAYLOR & HENNEKENS, 2018; GOMES-FILHO, et al., 2014).

Os microbiomas orais desempenham um papel importante na comunidade microbiana e na saúde humana (ZARCO et al., 2012). A seguir discorreremos sobre alguns desses microrganismos que foram alvo de nossos estudos com o extrato da *L. thymoides*.

A cavidade oral pode atuar como um reservatório para certos patógenos que podem causar infecções locais e sistêmicas, incluindo doença periodontal. O fungo oportunista *Candida albicans* tem um papel preponderante entre outras espécies do seu gênero na periodontite (MURPHY, et al., 2019). De fato, a presença de suas hifas foi demonstrada no tecido conjuntivo de pacientes periodontais, em associação com bactérias anaeróbias altamente invasivas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (REYNAUD, et al., 2001). *C. albicans* e *Candida dubliniensis* podem fazer parte do biofilme bacteriano e desempenham um papel fundamental na aderência do mesmo aos tecidos e desta forma favorecem a invasão (RUBIO, et al., 2015). Um estudo determinou a prevalência de espécies de *Candida* em bolsas periodontais de indivíduos imunodeprimidos residindo em Buenos Aires. Entre 76 leveduras isoladas, *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada (63%) (CUESTA, et al., 2010).

A colonização subgengival por *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foi descrita por outros autores (FURLLETTI, et al., 2008; KOGA-ITO, et al., 2008). Entre os diferentes agentes químicos utilizados, a clorexidina é bastante difundida por ter ação anti-séptica de amplo espectro. É usado na manutenção da terapia periodontal e como adjuvante do tratamento em procedimentos de raspagem e aplainamento radicular (GUARNELLI, et al., 2008). Outras substâncias como a própolis têm sido usadas sobretudo pela ação dos seus flavonóides (SIQUEIRA, et al., 2015). Como a *L. thymoides* é rica nesses compostos (MAGALHÃES, 2018;

LUCCHESI, et al., 2006), torna-se uma candidata natural no tratamento contra esses fungos.

Outro microrganismo alvo de nosso estudo, que apesar de não ser comum na cavidade oral pode causar grandes danos à saúde humana (HUANG, et al., 2019; SUGIMOTO, et al., 2017), foi a *Salmonella choleraesuis*. *Salmonella* é uma bactéria que possui duas espécies capazes de causar doenças em humanos: *S. enterica* e *S. bongori*. A *Salmonella enterica*, que possui maior relevância para a saúde pública, é composta por seis subespécies (*S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae*, *S. enterica subsp. indica*). A *Salmonella* spp. é geralmente referida por seu nome de sorotipo. Por exemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica* é dividida em numerosos sorotipos, incluindo *S. enteritidis* e *S. choleraesuis* (BRASIL, 2019).

Sorotipos de *Salmonella* não tifóide são as principais causas de infecções transmitidas por alimentos em todo o mundo. Eles ainda afetam seriamente a saúde humana e causam morbidade e mortalidade. As infecções por sorotipos não tifóides de *Salmonella* resultam mais frequentemente em gastroenterite aguda autolimitada que não requer terapia antimicrobiana. No entanto, aproximadamente 5% dos indivíduos com doença gastrointestinal causada por sorotipos não-tóxicos de *Salmonella* desenvolvem bacteremia. Crianças com certas condições subjacentes estão em maior risco de bacteremia, o que pode levar a infecções focais extraintestinais. Tais condições incluem idade muito jovem (bebês), HIV/AIDS, malignidades, terapia imunossupressora, anemia hemolítica e doença inflamatória intestinal (IYER, et al. 2018; LO, et al., 2018; CHEN et al., 1999; CHIU, et al. 1999).

A rizobactéria *Bacillus subtilis* tem sido usada para estudos genéticos e bioquímicos por várias décadas, e é considerada como paradigma de bactérias Gram-positivas formadoras de endósporos (MOSZER et al., 2002). Esse microrganismo vive em harmonia com o meio sendo muito estudados seus efeitos benéficos na periodontite (MESSORA, et al., 2016; TSUBURA, et al. 2009). Porém, sua capacidade de formar biofilmes (BRANDA et al., 2001; HAMON e LAZAZZERA, 2001), o torna de alta relevância na patogênese periodontal por agregar outros microrganismos e absorver DNA exógeno (ABRAHAM, et al., 2018).

Também implicada na disbiose periodontal a bactéria *Micrococcus luteus* é muitas vezes encontrada de maneira transitória na pele do ser humano. É muito

utilizada para a detecção de compostos antimicrobianos e pode estar associada à ocorrência de infecções como abscessos, pneumonia, artrite séptica, meningite, bacteremia e choque séptico em pacientes imunodeprimidos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Marion et al. (2014) encontraram esse microrganismo em cones de papel usados para tratamento endodôntico. Por ser um patógeno periodontal bastante conhecido é usado como indicador da eficiência de antimicrobianos (BLANDIZZI, et al. 1999).

Outro microrganismo importante na periodontite é o *Staphylococcus aureus*. Espécie bacteriana Gram-positiva e onipresente, o nicho ecológico de *S. aureus* em humanos é a narina anterior. Na população humana, aproximadamente 20-25% tornaram-se persistentemente colonizados e 75-80% intermitentemente ou nunca foram colonizados (DALLA"ANTONIA, et al. 2005; KLUYTMANS, et al. 1997). A formação de biofilme de *S. aureus* na cavidade bucal pode atuar como reservatório de infecções bucais. Esse patógeno está associado a casos refratários de periodontite mais difíceis de tratar (HEITZ-MAYFIELD & LANG, 2010).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram negativa aeróbica, não-fermentadora, muito importante na formação do biofilme bacteriano causador da periodontite (RYBTKE, et al., 2015). Segundo Muhlebach et al. (2006) e Taylor et al. (1990), *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* desempenham um papel importante na morbidade e mortalidade de pacientes com fibrose cística. Caldas et al. (2015), em um estudo caso-controle encontraram o mesmo clone bacteriano de *P. aeruginosa* na saliva, nos pulmões e na placa subgengival de pacientes com fibrose cística, o que sugere, segundo esse estudo, uma passagem ascendente ou descendente de bactérias na cavidade oral e nos pulmões destacando o possível papel de um reservatório desse patógeno na cavidade oral, constituindo uma potencial fonte de colonização pulmonar subsequente ou recolonização na fibrose cística.

Também correlacionada à periodontite, a *escherichia coli* é um microrganismo que pertence à família Enterobacteriaceae e entre suas principais características têm-se, bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás (MURRAY, 2002). Interessantemente Souto et al. (2006) em um estudo com 600 amostras, de fluido crevicular gengival, observaram que as espécies que predominaram

incluíram *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*. Em particular, *C. diphtheriae*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* foram significativamente mais prevalentes e detectadas em maior número nos sítios doentes de pacientes com periodontite em relação aos sítios de indivíduos com saúde periodontal. Sinais clínicos de doença periodontal apresentaram uma correlação positiva com as espécies *A. baumannii*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Além disso, as espécies *S. pyogenes* e *A. baumannii*, *C. diphtheriae* e *E. faecalis*, *C. diphtheriae* e *S. pyogenes*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* também demonstraram uma forte correlação positiva entre si. Assim, concluíram que bactérias patogênicas "não-orais" são detectadas em grande prevalência e altos níveis em sítios de pacientes com periodontite.

Esses achados demonstram que os microrganismos não estão isolados, ao contrário, fazem parte de uma microbiota que pode ou não tornar-se patogênica dependendo de sua interação com o meio

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O extrato metanólico das folhas de *Lippia thymoides* Mart & Schauer foi cedido pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). De forma resumida, a coleta do material vegetal foi realizada em novembro de 2015, na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas da Unidade Experimental do Horto Florestal. Uma exsicata da espécie oriunda desta coleção está depositada no Herbário da UEFS, sob número de registro 241404 (Figura 1). O extrato foi produzido a partir das folhas secas, por maceração em metanol assistida por ultrassom. (MAGALHÃES, 2018).

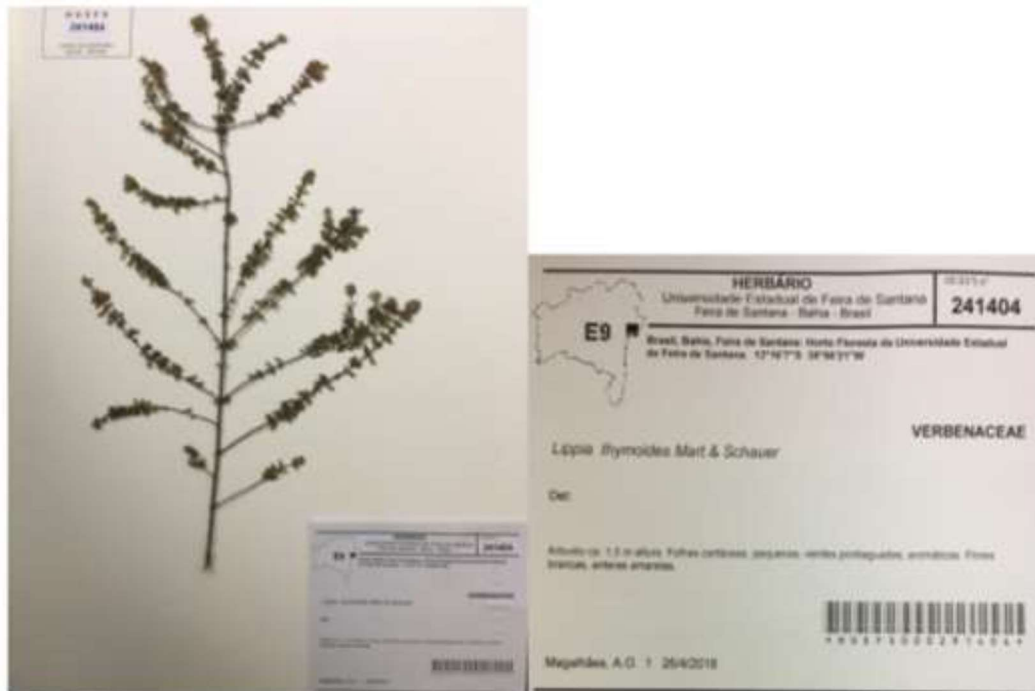


Figura 1: Exsicata de *L. thymoides* Mart & Schauer. Nº 241404 – Herbário, UEFS
Fonte: Magalhães, 2018

3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA

Alíquotas do extrato das folhas de *L. thymoides* Mart. & Schauer foram diluídas em metanol (Synth)/DMSO (Dimetilsulfóxido) (Synth) a 3% e filtradas com membrana estéril de diâmetro de 0,22 μ m para obtenção da concentração protéica. A dosagem de proteínas foi realizada com a técnica de Lowry modificada, de acordo com as instruções do fabricante (DC™ Protein Assay da Biorad, CA, USA) e os resultados foram obtidos pela leitura em espectrofotômetro.

3.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram convidados a compor amostra os indivíduos com boa saúde sistêmica que buscaram atendimento odontológico nos ambulatórios do curso de Odontologia da UEFS. Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo foram: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, uso de fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta.

Compuseram o grupo caso 17 indivíduos diagnosticados com periodontite, enquanto o grupo controle foi composto por 41 indivíduos sem periodontite. Os participantes receberam todas as devidas informações sobre a pesquisa e, posteriormente, foram preenchidos formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento informado, permanecendo uma cópia com os mesmos.

A avaliação da condição periodontal foi realizada por um examinador, cirurgião dentista, previamente treinado. Os resultados obtidos pelo examinador durante o período de calibração foram comparados com os resultados obtidos por um professor, Doutor em Periodontia, considerado no teste como padrão ouro.

A concordância das medidas clínicas foi calculada pelo índice Kappa interexaminadores, obtendo-se os valores de concordância de 0,83 e 0,74, para as medidas de profundidade de sondagem e recessão, respectivamente.

No exame periodontal, foram medidos: o índice de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem de sulco/bolsa e a recessão/hiperplasia gengival e obtidos os valores de nível de inserção para toda a cavidade bucal. Tais observações foram obtidas em seis diferentes locais para cada unidade dentária (disto-vestibular, médio-vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, médio-lingual, mesio-lingual), exceto para o índice de placa visível que foi avaliado apenas em 4 locais (mesial, distal, vestibular e lingual). Todas as medidas foram realizadas com o auxílio de uma sonda milimetrada do tipo Williams e registradas ficha de exame bucal formulada para este projeto.

O diagnóstico da condição periodontal foi realizado empregando-se o critério que considera com periodontite o indivíduo que apresentar pelo menos quatro dentes com no mínimo um sítio com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, perda de inserção maior ou igual a 3mm e sangramento à sondagem, no mesmo sítio (Gomes-Filho et al., 2007).

3.4 CULTURA DE CÉLULAS

Um volume de 30mL de sangue dos participantes da pesquisa foi coletado por punção venosa na fossa antecubital com tubo tipo Vacutainer estéril (BD-SP) heparinizado para a realização da cultura de sangue total de acordo com o protocolo modificado de Meyer e colaboradores (1982). Embora o uso de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) seja preconizado para esse tipo de

estudo, pois teremos apenas um tipo celular (linfócitos) produzindo citocinas, optamos por utilizar sangue total devido à dificuldades técnicas encontradas no decorrer do trabalho.

Em um fluxo laminar, em ambiente estéril, para cada participante, 2mL de sangue foram colocados em cada poço de uma placa de cultivo celular de 24 poços (COSTAR, Nova Iorque, EUA). As células foram cultivadas com 1,74 µg/ml de extrato imunogênico de *P. gingivalis* ATCC 33277 (NCBI Taxonomy ID: 431947), com 10 µg/mL do extrato de *L. thymoides* Mart. & Schauer ou com ambos os estímulos, concomitantemente. Um poço permaneceu apenas com o sangue total, representando o controle negativo, e em outro, foram colocados 10 µg/ml do mitógeno Pokeweed (*Phytolacca americana* ou PWM), como controle positivo. O extrato imunogênico de *P. gingivalis* foi produzido de acordo com o protocolo padronizado por Trindade et al. (2008).

As células foram cultivadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após 48h, as placas foram centrifugadas em centrífuga de placas refrigerada, para obtenção do sobrenadante, que foi armazenado a - 20°C até o momento das análises.

3.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE

3.5.1 Ensaio Toxicológico em Artêmia Salina

A toxicidade dos extratos foi avaliada in vitro em náuplios de *Artemia salina* segundo Meyer et al. (1982). Resumidamente, os extratos brutos vegetais foram dissolvidos em sulfóxido de dimetilo (DMSO) na concentração de 11 mg/ml e etanol P.A. Os ovos de *Artemia salina* Leach (*Artêmia Salina* do RN – 100% Cistos de *Artêmia Salina* da Costa Branca – embalagem de 500 mg) foram colocadas para eclodir no compartimento escuro do recipiente, contendo água marinha filtrada e esterilizada, e deixados em temperatura ambiente por 48 horas para a eclosão. Após período de incubação, dez náuplios foram transferidos para poços contendo água marinha.

As amostras foram transferidas para os poços contendo água do mar e *A. salina*, obtendo concentrações finais de 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL, com

volume final de 3 mL. Para o controle negativo e mortalidade, dez náuplios foram expostos a água marinha, outros dez a DMSO diluído em água, e dez em etanol.

3.5.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]) é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo extrato em estudo, no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e por consequência, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan), um sal de coloração arroxeada e insolúvel em água, pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (PEDROSA, 2011).

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

3.6.1 Difusão em Disco

A avaliação do potencial antimicrobiano foi efetuada de acordo com a norma M2-A8 da NCCLS (National Committee e Laboratory Standards Institute)/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As cepas bacterianas foram cultivadas por 24h em meio Müller Hilton (Himedia, Índia) e 48h em Ágar Saboroud Dextrose (Kasvi, Itália) em estufa bacteriológica a 37°C. As linhagens bacterianas e fúngicas usadas são pertencentes a *American Type Culture Collection* (ATCC). Dentro desta coleção, foram utilizadas as bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC94863), *Micrococcus luteus* (ATCC10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC14028) e os fungos, *Candida albicans* (ATCC18804) e *Candida glabrata* (CCT0728).

Foi preparada uma suspensão microbiana após o crescimento dos microrganismos usando uma solução salina a 0,9% estéril. Os inóculos de bactérias e fungos foram misturados na solução salina, ajustando-se até atingir a turbidez

comparável com a solução padrão de McFarland a 0,5, correspondendo de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. Com auxílio de um *swab* estéril, o inóculo da solução microbiana foi semeado em placa de petri contendo os meios de cultura respectivos para bactérias e fungos.

Os discos de 6mm contendo 10µl do solvente do extrato de *L. thymoides* (na concentração de 100mg/mL) foram colocados em triplicata, um disco controle contendo DMSO e um segundo contendo Cloranfenicol (Laborclin,SP, Brasil) (30µg) e Ciclopirox olaminam (Mupirox) (EMS,SP, Brasil). Após esta etapa, as placas contendo os discos foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C. A leitura foi realizada mensurando os halos inibitórios formados ao redor das bactérias e fungos, com o uso de uma régua milimetrada, junto à placa invertida, em 24 e 48h.

3.6.2 Concentração Mínima Inibitoria (MIC)

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) foi baseada no método de microdiluição em caldo proposta pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Norma M100-S15. As linhagens bacterianas utilizadas foram *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC14028) e para fungos *Candida albicans* (ATCC18804) e *Candida glabrata* (CCT0728).

Para a realização do ensaio, os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de ágar Müller Hilton (Himedia, Índia) e Ágar Sabourand dextrose (Kasvi, Itália) por 24 h para as bactérias e 48 h para os fungos. Em seguida, em placa de 96 poços estéril com tampas foram distribuídos 100 µl do meio de cultura *Broth* Nutriente (Himedia, Índia) em cada poço e o mesmo volume do extrato de *L. thymoides* na primeira fileira em triplicata. Para tanto, o mesmo volume foi adicionado para os controles (DMSO a 1% e cloranfenicol, para bactérias ou ciclopiroxilamina, para os fungos). Em seguida, foi feita uma diluição seriada, deixando a última fileira apenas com meio de cultura. Posteriormente, foram distribuídos 100 µl de suspensão microbiana em cada poço, exceto na última fileira. Ao final, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C (24 h para as bactérias e 48 h para os fungos) para avaliação do efeito do extrato a seu modo de ação bacteriostático ou bactericida.

3.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS

As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-13, IFN- γ , IL-10 e IL-17 nos sobrenadantes das culturas de células foram mensuradas usando-se kits disponíveis comercialmente (Biolegend ELISA MAX™ Standard Set, San Diego, CA - USA). Os ensaios foram realizados usando-se placas de poliestireno de alta adsorção com 96 poços de fundo chato (COSTAR, Coornig Life Science, Tewksbury, MA, EUA). As amostras foram diluídas conforme padronização prévia em diluente de reagente recomendado pelo fabricante e todas as demais etapas foram realizadas também de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica foi determinada em Leitora de ELISA (ELx 800 – Bio-Tek) ajustada para um comprimento de onda na faixa de 450 nm.

3.8 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE DADOS

Inicialmente, foi realizada a análise descritiva dos dados relativos a gênero, idade, e descritores clínicos, visando a caracterização dos grupos.

Os valores dos níveis de citocinas obtidos nos dois grupos foram submetidos à análise para a identificação da distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, para a seleção dos testes a serem empregados, utilizando-se o programa SPSS 23.0. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados em um nível de significância de 5%.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), de acordo com a Resolução 466/12, que rege a pesquisa em seres humanos. Foram obtidos termos de consentimento livre e esclarecido dos indivíduos selecionados, ou de seus responsáveis, para participar do projeto. Os informes para consentimento escrito explicam em linguagem clara e acessível, os procedimentos a serem empregados e

suas finalidades. O projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana, sendo o número do parecer: 1.344.223.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS

Foram convidados a participar do presente estudo cerca de 150 indivíduos. Retirando-se os que se recusaram e os que não atenderam aos critérios de elegibilidade, 58 foram incluídos no estudo. O grupo com periodontite (CP), diagnosticado segundo os critérios de Gomes-Filho et al. (2007), foi composto por 17 participantes (29,31%), enquanto no grupo sem periodontite (SP), foram incluídos 41 participantes (70,69%).

A distribuição dos dados relativos à idade foi normal em ambos os grupos, tendo sido utilizado, portanto, o teste T de Student. Os dados relacionados aos descritores clínicos, por não apresentarem normalidade, foram comparados com o teste de Mann-Whitney. Como pode ser observado na tabela 1, a média de idade dos participantes do grupo CP foi de $43,18 \pm 11,01$ anos, sendo a idade mínima 21 anos e a máxima, 58 anos. Já a média de idade dos participantes do grupo SP foi de $38,44 \pm 12,81$ anos, com idades entre 18 e 75 anos. Com relação ao sexo dos voluntários, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,012$): entre os participantes do grupo CP, 10 (58,8%) eram do sexo feminino e 7 (41,2%) eram do sexo masculino. Já no grupo SP, 10 (24,4%) eram do sexo feminino e 31 (75,6%) do sexo masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no número de dentes presentes na boca ($p=0,450$), média de 22,00 no grupo SP e 21,88 no grupo CP. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na idade ($p=0,165$).

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na comparação dos descritores clínicos relacionados à condição periodontal dos participantes. A mediana do percentual de sítios com sangramento à sondagem foi de 45,65 % (IQ 28,55%-69,78%) no grupo CP, enquanto que o valor para o grupo SP foi de 9,52 % (IQ 3,67%-32,4%) ($p=0,001$). A mediana do percentual de sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm, no grupo CP foi de 16,66 % (IQ 8,27%-38,48%), enquanto no grupo SP foi de 0,0 % (IQ 0,0%-3,77%), com diferença

estatisticamente significativa ($p=0,000$). Houve diferença também no percentual de sítios com nível de inserção clínica $\geq 3\text{mm}$, com mediana de 51,85 % (IQ 15,06%-76,06%) no grupo CP e 7,63% (IQ 2,15%-18,37%) no grupo SP ($p=0,000$).

Tabela 1: Distribuição das características clínicas entre os grupos.

Descritores Clínicos	Classificação da periodontite segundo Gomes-Filho (2007)				P
	Com periodontite N=17		Sem periodontite N=41		
Número de dentes(n)					
Média ± dp	21,88 ± 4,97		22,00 ± 6,63		0,450**
Mediana(IQ)	22,00(19,0-26,0)		24,00(19,5-27,0)		
Idade					
Média ± dp	43,18 ± 11,01		38,44 ± 12,81		0,165*
Mediana(IQ)	46,00(39,0-50,5)		36,00(29,0-44,5)		
Percentual de sítios com sangramento a sondagem (%)					
Média ± dp	48,24 ± 29,69		20,34 ± 24,38		0,001**
Mediana(IQ)	45,65(28,56-69,78)		9,52(3,67-32,41)		
Percentual de sítios com nível de inserção clínica $\geq 3\text{mm}$ (%)					
Média ± dp	46,66 ± 33,83		17,65 ± 24,72		0,000**
Mediana(IQ)	51,85(15,1-76,1)		7,63(2,15-18,37)		
Percentual de sítios com profundidade de sondagem $\geq 4\text{mm}$ (%)					
Média ± dp	25,41 ± 23,73		2,18 ± 3,55		0,000**
Mediana(IQ)	16,66(8,27-38,48)		0,0(0,0-3,77)		
Sexo					
	N	%	N	%	0,012***
Masculino					
	10	(58,8%)	10	(24,4%)	
Feminino	7	(41,2%)	31	(75,6%)	

P= valor de nível de significância $\geq 0,05$

*Teste T de Student

** Teste Mann-Whitney

*** Teste Qui - Quadrado

4.2 TESTE DE CITOXICIDADE EM ARTEMIA SALINA

Para o teste de citotoxicidade, o extrato de *L. thymoides* foi diluído com dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1000 µg/ml, 100 µg/ml e 10 µg/ml (Figura 2). Nota-se que nas primeiras 24 horas houve uma mortalidade de 3% na concentração de 1000 µg/ml, enquanto nas outras concentrações não houve mortalidade. O mesmo ocorreu com o tempo de 48 horas. Já no tempo de 72 horas houve uma mortalidade de 10% na concentração de 1000 µg/ml, 0% na concentração de 100 µg/ml e 10% na concentração de 10 µg/ml.

Na figura 3 é demonstrada a citotoxicidade do extrato da planta diluído com etanol. Nas primeiras 24 horas não houve mortalidade em nenhuma das concentrações. Em 48 a concentração de 1000 µg/ml apresentou uma taxa de mortalidade de 10% enquanto as outras concentrações não tiveram mortalidade. Com 72 horas a concentração de 1000 µg/ml teve uma mortalidade de 13%, enquanto na concentração de 100 µg/ml foi de 7% e na de 10 µg/ml, 3%.

Os resultados dos controles do ensaio utilizando somente os diluentes (DMSO e etanol), sem adição do extrato, e a água do mar, estão representados na figura 4. Nas primeiras 24 horas, as colônias com água do mar e DMSO tiveram uma mortalidade de 3%, enquanto que as colônias com etanol não tiveram mortalidade, o mesmo ocorrendo com 48 horas. Com 72 horas as colônias com água do mar e etanol tiveram uma taxa de mortalidade de 35% e aquelas com DMSO 7%.

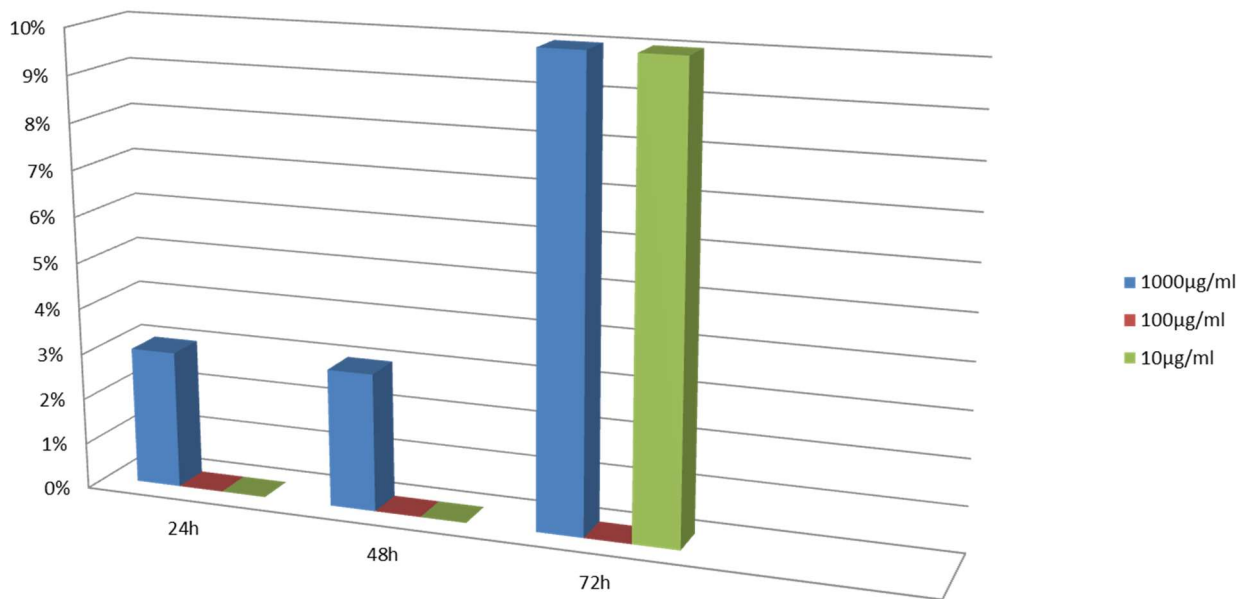


Figura 2: Citotoxicidade do extrato de *Lippia thymoides* diluído em DMSO em *Artemia salina*.

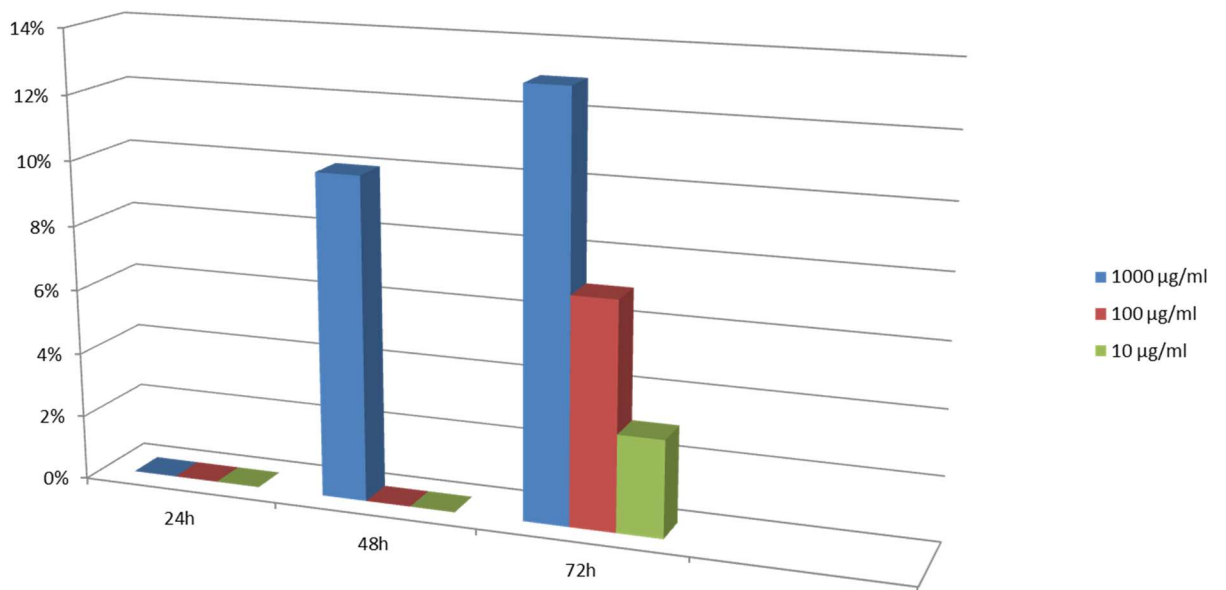


Figura 3: Citotoxicidade do extrato de *Lippia thymoides* diluído em etanol em *Artemia salina*.

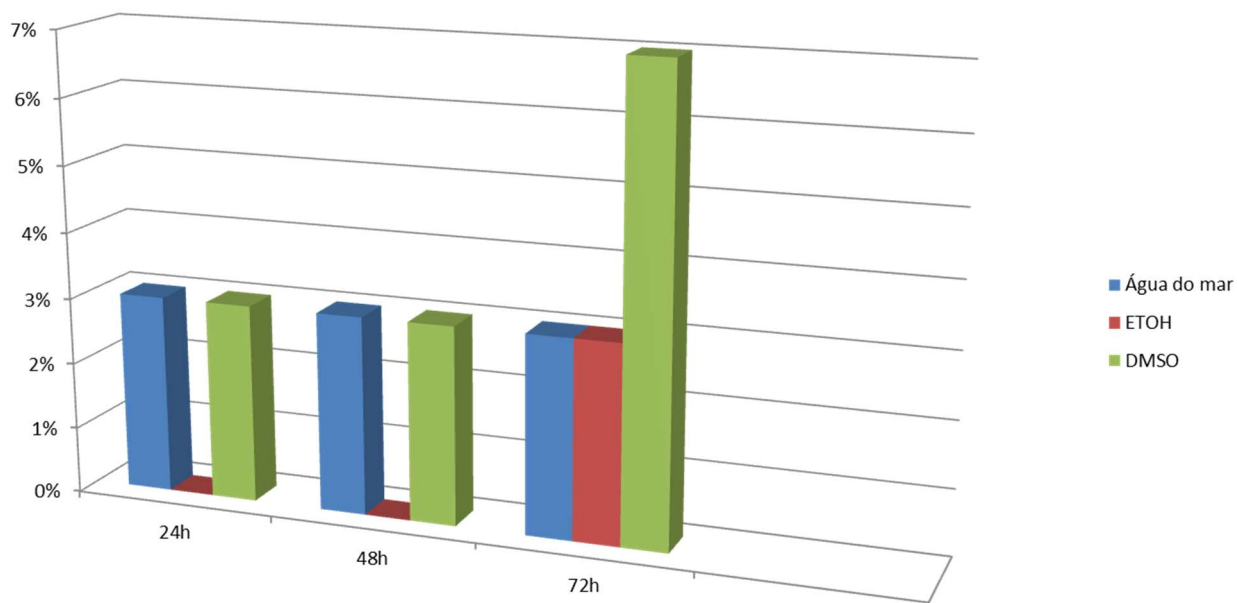


Figura 4: Citotoxicidade dos controles água do mar, etanol e DMSO em *Artemia salina*.

4.3 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry modificado, obtendo-se as concentrações proteicas do extrato metanólico da planta a partir das densidades ópticas da curva padrão. Assim, a concentração de proteínas determinada no extrato das folhas *Lippia thymoides* sem diluição foi de 3,314mg/ml , conforme pode ser observado na figura 5.

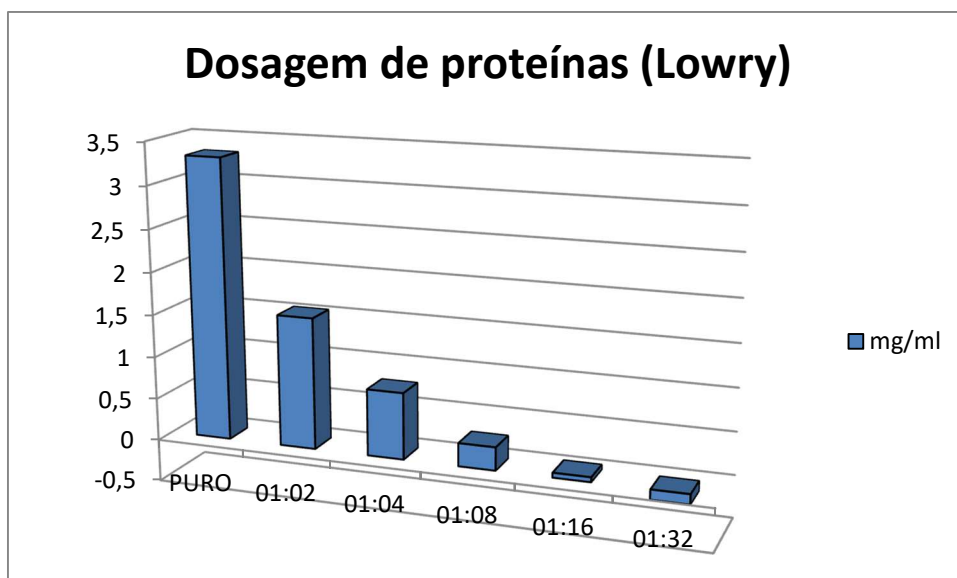


Figura 5: Curva de diluição do extrato das folhas de *Lippia thymoides* para dosagem de proteínas por comparação com curva padrão de albumina sérica bovina (método de Lowry modificado).

4.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O extrato das folhas de *Lippia thymoides* diluído em metanol (50%) e DMSO 3% não apresentou efeito citotóxico para CMSP humanas nas concentrações de 1%, 5%, 10% e 20% (Figura 6), ou seja, não houve diminuição na redução significativa do MTT pelas células cultivadas com os extratos nas referidas concentrações, quando comparadas àquelas cultivadas apenas com meio de cultura (branco).

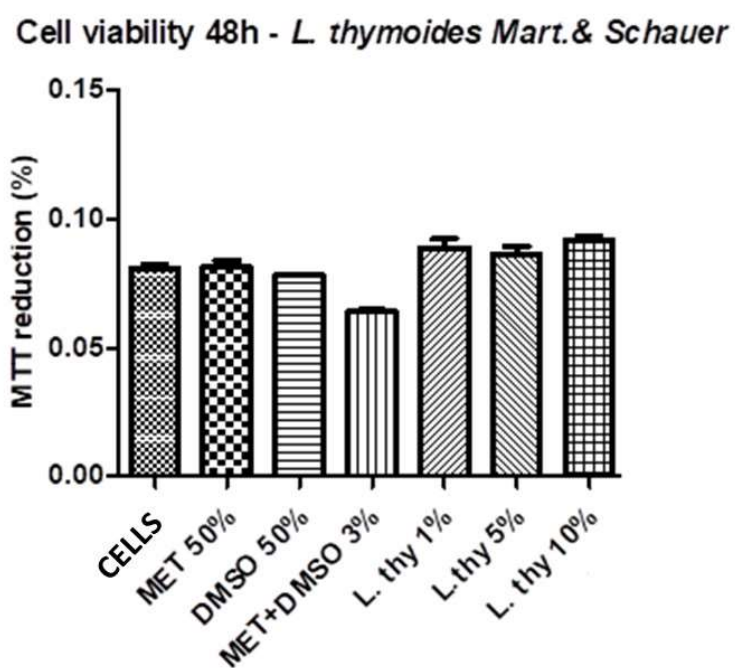


Figura 6: Efeito citotóxico das células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Avaliação da viabilidade celular de CMSP, durante 48h à 37°C e 5% de CO₂ pela técnica do MTT-tetrazólio [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)]. P < 0,05. Teste One-way ANOVA.

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

A concentração de das citocinas IL-1 β , IL-13, IL-10, INF- γ e IL 17 foi dosada no sobrenadante de cultura de células de indivíduos com e sem periodontite cultivadas com o extrato de *L. thymoides* a 10%, com e sem a presença do extrato de *Porphyromonas gingivalis*. Como os dados não apresentaram normalidade, as variáveis foram comparadas com o teste de Mann-Whitney.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem periodontite nas concentrações de IL-1 β (Figura 7) quando as células foram estimuladas com o extrato de *P. gingivalis* (p=0,007) e quando as células foram estimuladas com o extrato das folhas de *L. thymoides* (p=0,004). O grupo sem periodontite apresentou níveis mais elevados do que o grupo com periodontite nos dois casos. Quando as células foram estimuladas concomitantemente com o extrato de *L. thymoides* e o extrato de *P. gingivalis* (LT+Pg), é possível observar que o grupo com periodontite apresentou níveis mais elevados de IL-1 β (2,53 pg/mL) do que o grupo sem a doença (3,28 pg/mL), porém esta diferença não apresentou significância estatística (p=0,092).

IL 1 β

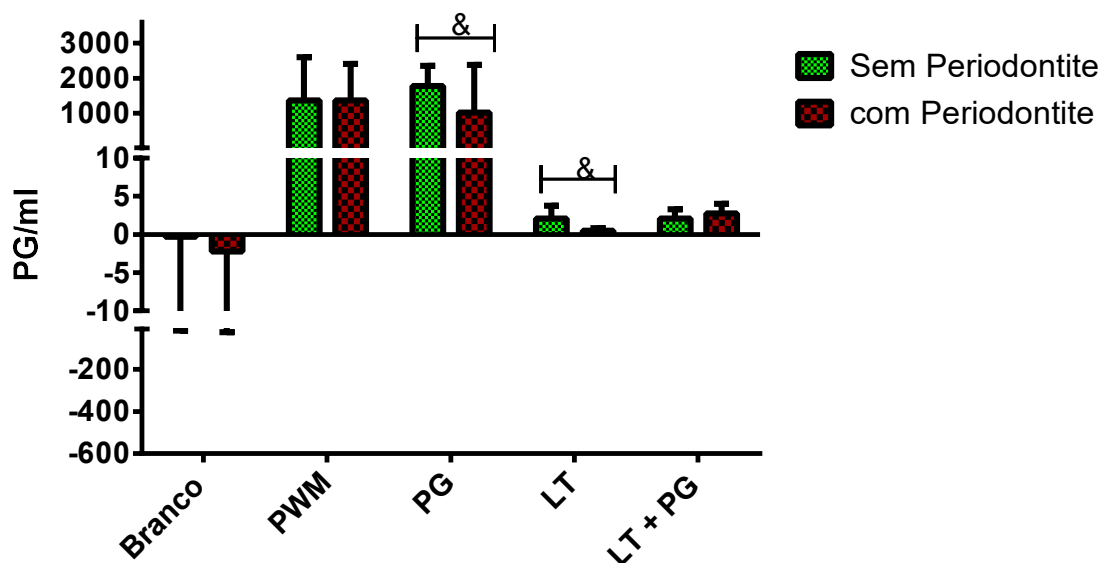


Figura 7: Concentração de IL 1 β no sobrenadante do sangue total de voluntários com periodontite e sem periodontite. $P \geq 0,05$. & = Apresentou diferença estatisticamente significativa.

Em relação à dosagem de IL 13 (Figura 8), em geral as concentrações encontradas foram muito baixas, não havendo diferença entre os grupos para todas as condições de estímulo empregadas na cultura das células do sangue total (Branco, $p=0,626$; PWM, $p=0,409$; PG, $p=0,386$; LT, $p=0,348$; LT+PG, $p=0,169$).

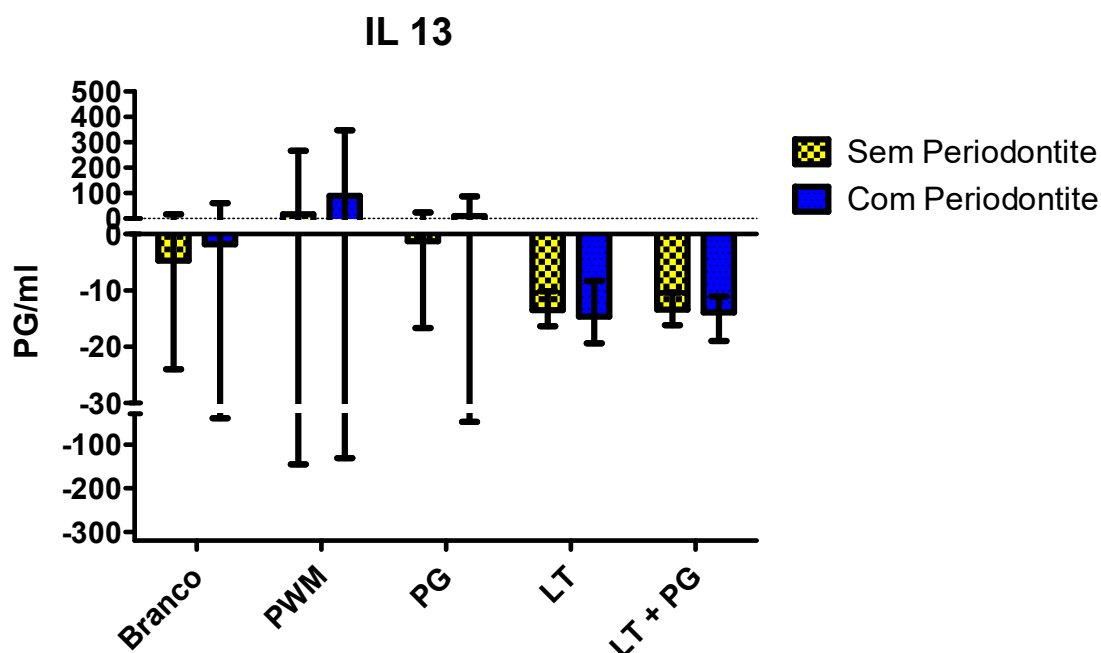


Figura 8: Concentração de IL 13 no sobrenadante do sangue total de voluntários com periodontite e sem periodontite. $P \geq 0,05$

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos sem periodontite e com periodontite nas concentrações de IL-10 (Figura 9) para todos os estímulos (Branco, $p=0,593$; PWM, $p=0,624$; PG, $p=1,000$; LT, $p=0,221$; LT+PG, $p=0,624$). Entretanto, é possível observar que a concentração desta citocina foi maior no grupo sem periodontite em todas as condições de estímulo estudadas.

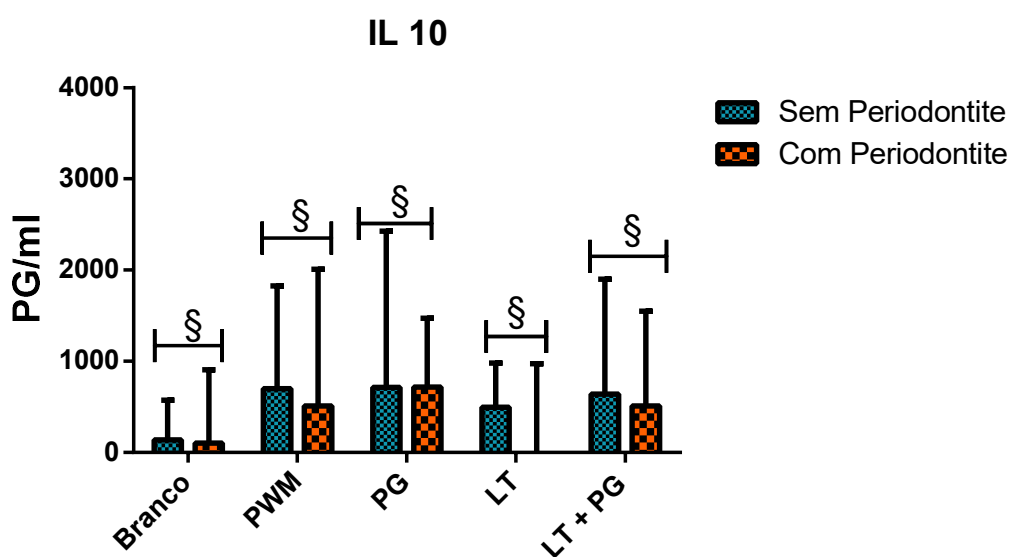


Figura 9: Concentração de IL 10 no sobrenadante do sangue total de voluntários com periodontite e sem periodontite. $P \geq 0,05$. § = Apresentou diferença estatisticamente significativa.

4.5.1 Comparação entre os Estímulos Empregados na Cultura Celular

As concentrações das citocinas no sobrenadante de cultura das células humanas, independentemente da presença ou ausência de doença no indivíduo, foram comparadas com relação às condições de cultivo empregadas. Como os dados não apresentaram normalidade, as variáveis foram comparadas com o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

O extrato de *P. gingivalis* induziu níveis mais elevados de IL-10 ($p=0,004$), IL-17 ($p=0,006$), IFN- γ ($p=0,000$), IL-1 β ($p=0,000$) em relação aos níveis apresentados pelas células cultivadas sem estímulo (branco). Não houve diferença em relação a IL-13 ($p=0,099$).

O extrato da *L. thymoides* inibiu a produção de IL-13 ($p=0,000$) e induziu maior produção de IFN- γ ($p=0,019$) quando comparado com a ausência de estímulo (branco). Contudo não foi encontrada diferença na IL-10 ($p=0,253$), IL-17 ($p=0,300$) e IL-1 β ($p=0,111$).

Quando as células foram cultivadas em presença concomitante dos extratos de *L. thymoides* e *P. gingivalis*, foi encontrada uma maior produção de IL-10 ($p=0,007$) e IL-17 ($p=0,039$), bem como menor produção de IL-13 ($p=0,000$), quando comparadas às células cultivadas sem estímulo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de IFN- γ ($p=0,75$) e IL-1 β ($p=0,106$).

As células cultivadas com o extrato de *P. gingivalis* apresentaram concentrações mais elevadas de IL-10 ($p=0,042$), IL-17 ($p=0,038$), IL-1 β ($p=0,000$) e IL-13 ($p=0,000$), quando comparadas àquelas induzidas pelo extrato de *L. thymoides*. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa na produção de IFN- γ ($p=0,203$).

Interessantemente, quando o extrato de *L. thymoides* foi empregado concomitantemente com o extrato de *P. gingivalis*, os níveis de IL-1 β ($p=0,000$) e IL-13 ($p=0,000$) foram reduzidos, em relação àquelas observados quando o extrato de *P. gingivalis* fora empregado isoladamente. Não foram observadas diferenças na produção de IL-10 ($p=0,508$), IL-17 ($p=0,606$) e IFN- γ ($p=0,161$).

Finalmente, comparando as concentrações das citocinas observadas no sobrenadante das células cultivadas com o extrato de *L. thymoides* e das células cultivadas com o extrato de *L. thymoides* juntamente com o extrato de *P. gingivalis*,

houve diferença na produção de IL-1 β (p=0,007) e não houve para IL-13 (p=0,910), IL-10 (p=0,070), IL-17 (p=0,121) e IFN- γ (p=0,522).

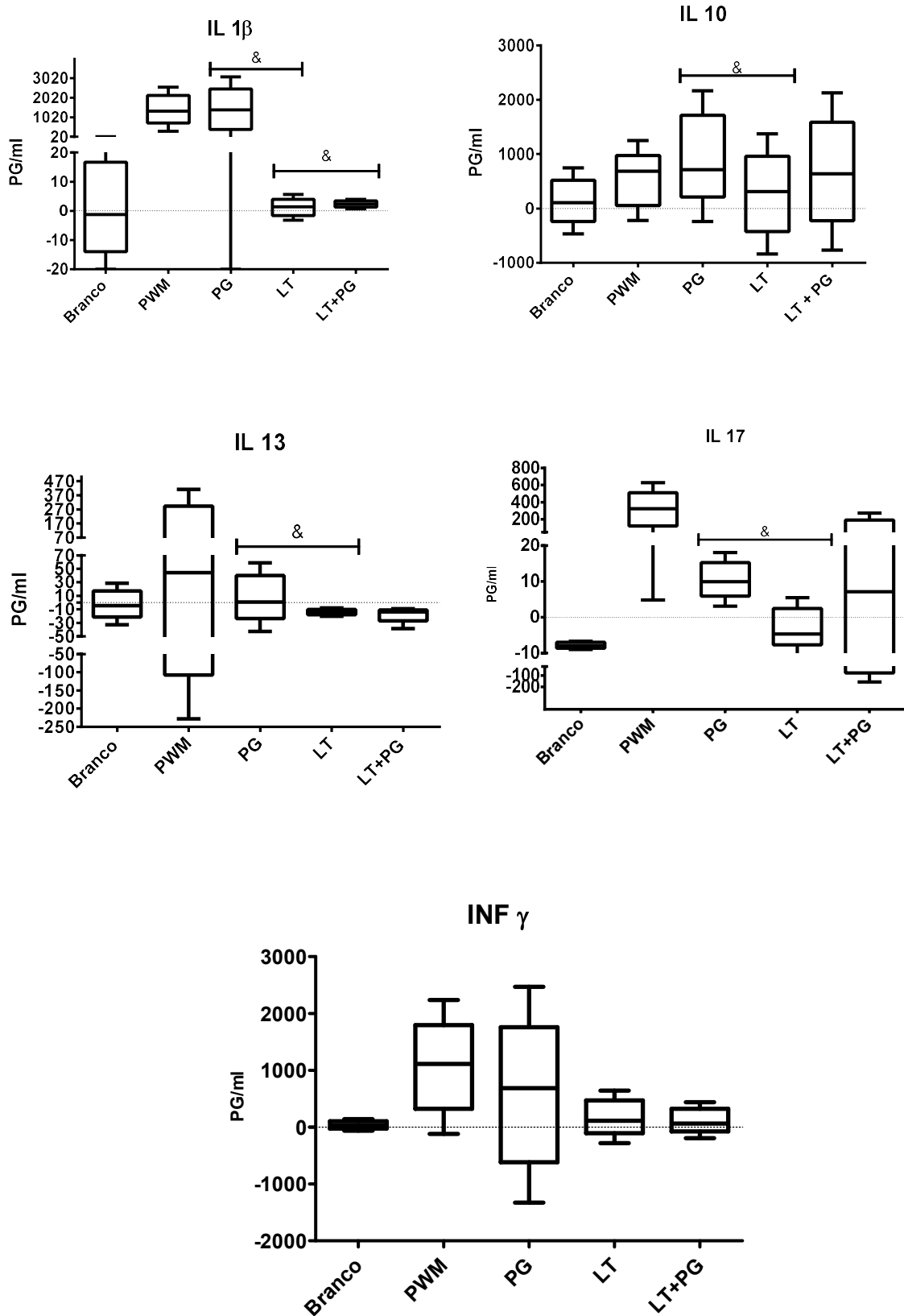


Figura 10: Gráficos comparativos entre as citocinas: IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ . P \geq 0,05. & = Apresentou diferença estatisticamente significativa.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.6.1 Teste de Difusão em Disco

Os resultados do teste de difusão em disco, usado para avaliar a atividade antimicrobiana da planta, estão demonstrados nas tabelas 2 e 3 e na figura 11. O extrato metanólico da *L. thymoides* apresentou atividade em relação às bactérias *P. aeruginosa* (8,33 \pm 0,58), *S. aureus* (9,66 \pm 0,58) e *S. choleraesuis* (7,33 \pm 1,53) (Tabela 2). Entre os fungos apresentou atividade em relação a *C. albicans* (11,33 \pm 2,31) (Tabela 3).

4.6.2 Ensaio da Concentração Mínima Inibitória

Ensaio da Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi realizado para avaliar o efeito inibitório do extrato metanólico de *Lippia thymoides* em 24h para bactérias e 48h para fungos (Tabela 4).

O extrato da planta se mostrou bactericida para os microrganismos *M. luteus* e *S. aureus* e bacteriostático para *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. Em relação aos fungos, se mostrou fungicida para *C. glabrata* e fungistático para *C. albicans*.

Tabela 2: Halos de inibição das espécies de bactérias pelo extrato metanólico das folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, obtidos com o teste de difusão em disco realizado em 24h

Microrganismo	Controle Metanol/DMSO 3% (CN)	Controle Clorafenicol (10 μ g/mL) (CP)	Concentração do extrato das folhas de <i>L. thymoides</i> (100mg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	R	30	SA
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 94863)	R	24	SA
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	R	35	SA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	R	25	(8,33 \pm 0,58)

<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	R	25	(9,66±0,58)
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC14028)	R	23	(7,33±1,53)

Fonte: o autor

CN=Controle Negativo, CP= Controle Positivo, R=Resistente(halo <1mm), SA= Sem atividade.

Tabela 3: Halos de inibição das espécies de fungos pelo extrato metanólico das folhas de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer, obtidos com o teste de difusão em disco realizado em 48h

Microrganismo	Controle Metanol/DMSO 3% (CN)	Controle Ciclopiroxilamina (100mg/mL) (CP)	Concentração do extrato das folhas de <i>L. organoides</i> (100mg/mL)
<i>Candida albicans</i> (ATCC18804)	R	22	(11,33±2,31)
<i>Candida glabrata</i> (CCT0728)	R	30	SA

Fonte: o autor

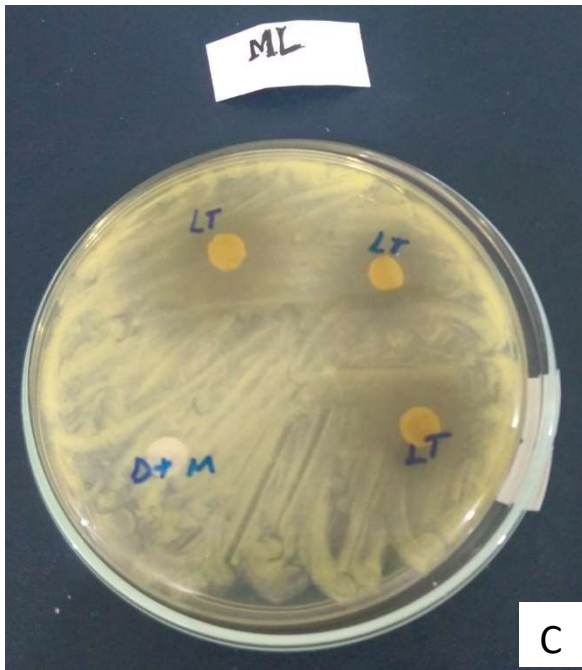
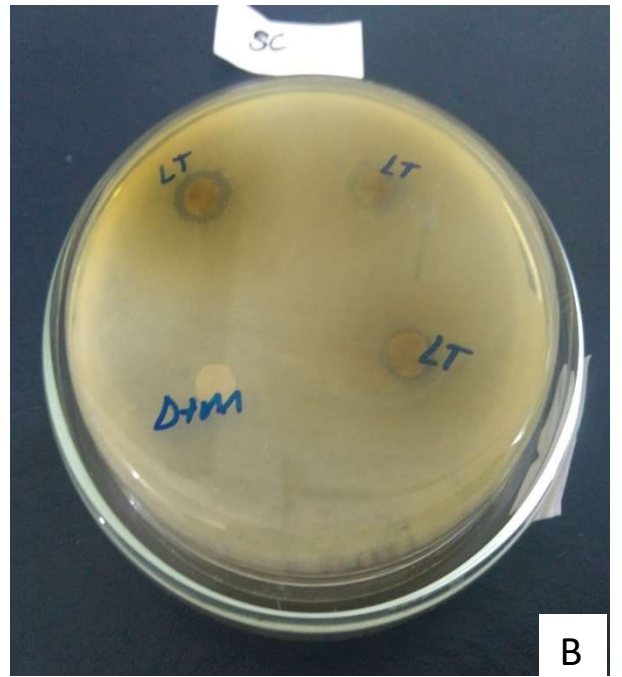
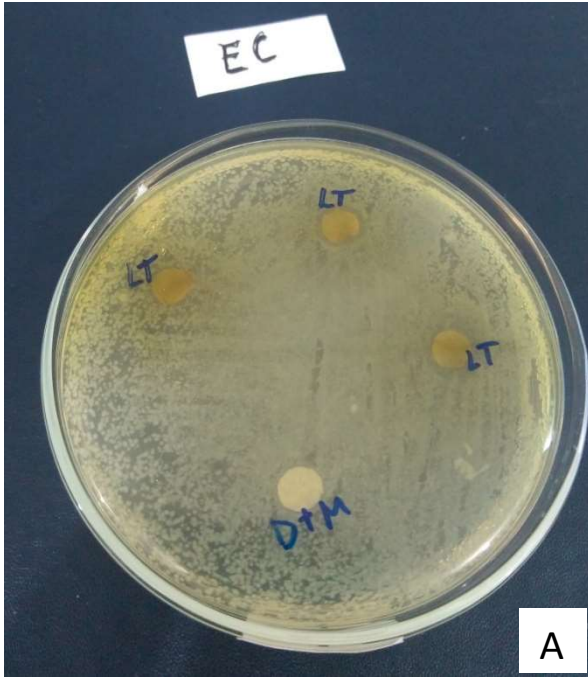
CN=Controle Negativo, CP= Controle Positivo, R=Resistente(halo <1mm), SA= Sem atividade.

Tabela 4: Ensaio da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e o efeito inibitório do extrato metanólico de *Lippia thymoides* avaliadas 24h para bactérias e 48h para fungos.

Microrganismo	Concentração Mínima Inibitória (MIC) mg/mL	Efeito Antimicrobiano
BACTÉRIAS		
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	SA	Bacteriostático
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 94863)	SA	Bacteriostático
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	1000	Bactericida
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	31,25	Bacteriostático

<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	1000	Bactericida
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC14028)	SA	Bacteriostático
FUNGOS		
<i>Candida albicans</i> (ATCC18804)	31,25	Fungistático
<i>Candida glabrata</i> (CCT0728).	250	Fungicida

Fonte: autor.
SA= Sem atividade



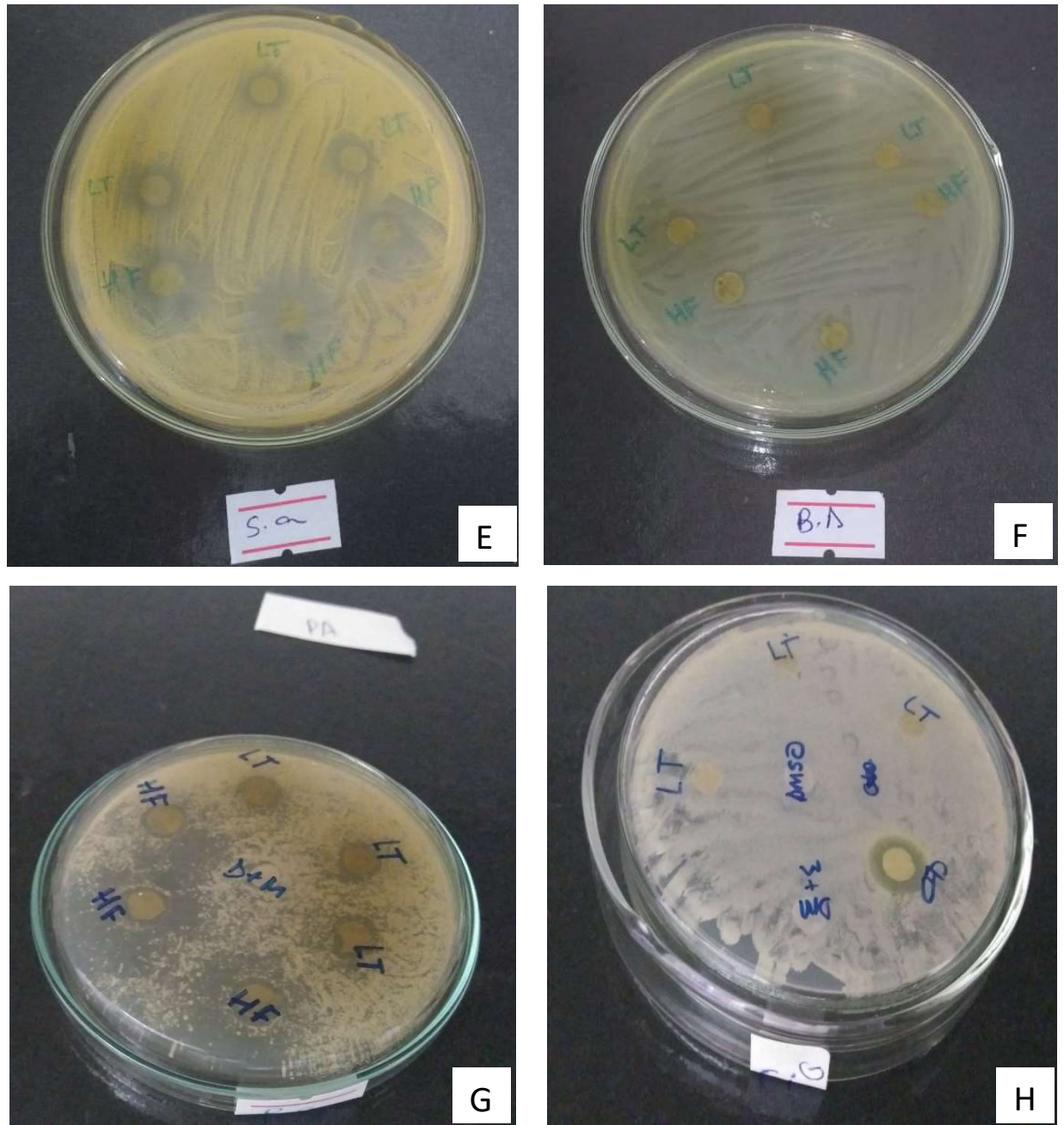


Figura 11: Alos de inibição da *L. thymoides*: (A) *Escherichia coli*, (B) *Salmonella choleraesuis*, (C) *Micrococcus luteus*, (D) *Candida albicans*, (E) *Staphylococcus aureus*, (F) *Bacillus subtilis* (G) *Pseudomonas aeruginosa*, (H) *Candida glabrata*

5 DISCUSSÃO

Um dos principais achados do presente estudo mostrou que o extrato de *L. thymoides* pode inibir a produção *in vitro* de IL-1 β e IL-13, contrapondo a ação do extrato de *Porphyromonas gingivalis* no sobrenadante de sangue total humano. *P. gingivalis* é um microrganismo anaeróbio gram-negativo, considerado um patógeno chave na disbiose periodontal (BLASCO-BAQUE, et al, 2017; OLSEN, et al., 2017). Possui inúmeras moléculas com características de antigenicidade, que interagem com o tecido do hospedeiro, induzindo a produção de citocinas, como IL 10, IL 1 β , IL 6, INF- γ , TNF- α , IL 8, IL 13, IL 17 e IL 23. (KARIU et al., 2019; CARDOSO, et al., 2018; FERREIRA, et al., 2017; FIGUEREDO, et al., 2017; MAEKAWA et al., 2014 TRINDADE et al., 2013).

Estes mediadores participam da patogênese da periodontite permitindo a migração de precursores de osteoclastos para a superfície óssea, onde ocorre a fusão dos precursores, dando origem aos osteoclastos. O eixo RANKL-RANK – osteoprotegerina (OPG) é considerado crucial neste processo (SOKOS, et al., 2014). Os fibroblastos do ligamento periodontal produzem principalmente OPG, uma molécula inibidora de osteoclastogênese. No entanto, eles podem ser influenciados *in vivo* por interações indiretas com bactérias, o que justifica o estudo do potencial antimicrobiano da planta no nosso trabalho, ou por carga mecânica. Incubação de fibroblastos do ligamento periodontal com bactérias ou componentes bacterianos causa aumento da expressão de RANKL e outras moléculas estimulantes da osteoclastogênese, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator estimulante de colônia de macrófagos (MCSF) (THIELE, et al, 2018; SOKOS, et al., 2014) o que denota a importância do estudo de mediadores químicos como as citocinas, na patogênese periodontal.

Os mediadores incluídos na resposta do hospedeiro podem, conseqüentemente, regular positivamente a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) nas lesões afetadas pela periodontite (SORSA, et al., 2015). As MMPs representam uma estrutura de proteases relacionadas, mas geneticamente distintas, que atuam não apenas no desenvolvimento fisiológico e remodelação tecidual, mas também no patológico. As MMPs podem degradar coletivamente quase todos os componentes da matriz extracelular e da base da membrana, e sua atividade

patologicamente excessiva leva à destruição do tecido periodontal (SALAZAR, 2013; SORSA, et al., 2006).

A citocina pró-inflamatória IL 1 β , é expressa por muitas células, incluindo macrófagos, células NK, monócitos, células dendríticas e neutrófilos (GIRALDO et al., 2009). Patógenos periodontais, como *Porphyromonas gingivalis*, são capazes de produzir moléculas que podem estimular a sua produção (SANTOS-LIMA et al., 2019; TRINDADE et al., 2012). Esta citocina está envolvida no desequilíbrio do eixo RANK-RANKL-OPG, sendo responsável por ocasionar reabsorção óssea alveolar (PETEAN, et al., 2019;). Portanto, substâncias que consigam inibir a produção da IL 1 β podem reduzir a reabsorção óssea alveolar por inibição dessa citocina (AOKI-NONAKA, et al. 2019; KOOK et al., 2017) o que ocorreu com a utilização dos extratos da *L. thymoides* nos nossos estudos.

Já a IL-13, uma citocina do perfil de resposta imune Th2, atua suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos / macrófagos (CHEN, et al., 2016). Sendo assim, a inibição destes dois mediadores pode indicar um potencial papel imunomodulador do extrato de *L. thymoides* que pode proteger os tecidos do início e da progressão da periodontite.

Por outro lado, existem estudos que afirmam que a polarização da resposta do hospedeiro para um perfil do tipo Th2 pode ser protetora contra o avanço da periodontite (CARVALHO-FILHO, et al., 2016). O extrato da *L. thymoides* inibiu a produção de IL-13 em relação às células cultivadas sem estímulo. Como a IL-13 induz tanto a regulação de TGF- β , como suprime a produção de matriz de metaloproteinase 1, impedindo a destruição de colágeno (BROWN-LOBBINS, et al., 2018), esse resultado pode contraindicar o uso do extrato da planta na periodontite. Contudo, nos experimentos executados neste estudo, as concentrações de IL 13 detectadas, tanto no grupo CP como no SP, foram muito baixas, o que poderia implicar, *in vivo*, em uma menor atuação desta citocina na patogênese da doença. Testes de funcionalidade seriam necessários para uma melhor compreensão do papel das citocinas no contexto do microambiente periodontal, com a presença de outras bactérias e de diversos mediadores sendo produzidos concomitantemente.

Notadamente, o extrato de *L. thymoides* mostrou a capacidade de modular negativamente a sua produção de IFN- γ induzida por *P. gingivalis*, uma vez que a sua produção pelas células cultivadas com os extratos da planta e da bactéria foi inferior

àquela observada no sobrenadante de cultura das células cultivadas em presença apenas da bactéria. Embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativamente, é possível observar graficamente a sua relevância, sugerindo a necessidade de discussão deste achado. É possível que o pequeno tamanho da amostra tenha impactado no poder do teste estatístico. O IFN- γ é uma citocina de assinatura do perfil de resposta Th1, responsável classicamente pela proteção contra patógenos intracelulares (ABBAS, et al., 2015). Apesar de ser um patógeno extracelular, *P. gingivalis* pode, facultativamente, infectar células do hospedeiro, como macrófagos e fibroblastos e induzir a produção de IFN- γ (GMITEREK, et al., 2016). Esta citocina possui potente ação pró-inflamatória em imunidade inata e adaptativa não só induzindo a produção de citocinas e quimiocinas, (ISAZA-GUZMÁN, et al., 2015) mas também pela regulação positiva da expressão de várias proteínas de membrana incluindo classe I e II dos principais antígenos do complexo de histocompatibilidade (MHC), receptores Fc, moléculas de adesão de leucócitos e antígenos da família B7. Além disso, o IFN- γ é um potente ativador de macrófagos de funções efetoras. Direciona a síntese, troca de classes, e secreção de imunoglobulinas pelas células B (PESTKA S.; et al., 2004).

Em relação à IL-10 e à IL-17, os resultados mostram que o extrato de *P. gingivalis* é capaz de aumentar a sua concentração, porém o extrato de *L. thymoides* não é capaz de modular a sua produção, já que os seus níveis permaneceram elevados quando as células foram cultivadas com os dois extratos. A manutenção de concentrações elevadas de IL-10 pode ser um aspecto positivo, já que esta citocina exerce papel importante na regulação da resposta imune, sendo uma potente citocina anti-inflamatória, além de contribuir para a manutenção da massa óssea por meio da inibição da reabsorção óssea osteoclástica e da regulação da formação óssea osteoblástica (ZHANG et al., 2014; TRINDADE et al., 2012). O polimorfismo no gene IL-10 (-597) em indivíduos com periodontite pode levar à menor produção desta citocina, estando esses indivíduos sujeitos a uma maior destruição tecidual (TOKER, et al., 2018).

Já a IL-17 é a citocina de assinatura do perfil Th17, caracterizado pelo grande envolvimento de neutrófilos na resposta a infecções. Esta característica é muito destacada na periodontite, cuja participação neutrofílica é amplamente relatada (THORBERT-MROS, et al., 2019; BATOOL, et al., 2018). Foi demonstrado que *P.*

gingivalis induz um aumento nos níveis de IL 17 em células mononucleares do sangue periférico, o que leva a uma maior expressão de células T CD4+ (CHENG et al. 2016). Esta exacerbação da resposta imune, tanto inata quanto adaptativa, pode ser responsável não apenas pela defesa contra a infecção periodontal, mas também pela destruição dos tecidos periodontais (SOMMER, et al., 2019).

Interessantemente, na comparação da produção de citocinas entre indivíduos doentes e não doentes, o grupo de indivíduos sem periodontite apresentou níveis mais elevados de IL-1 β do que o grupo com periodontite quando as células foram estimuladas com o extrato de *P. gingivalis* e com o extrato das folhas de *L. thymoides* isoladamente. É possível que o papel local desta citocina seja mais relevante que sua atuação à distância, já que sua presença é marcante no fluido gengival e nos tecidos doentes (ROMANO, et al., 2018). Uma das limitações deste estudo é a utilização de células do sangue periférico e não de células locais. Isto é minimizado pelo emprego de antígenos em cultura, simulando a ação parácrina das citocinas, mais intensa que sua ação endócrina.

Outra limitação do estudo é o pequeno tamanho da amostra, peculiar aos ensaios *in vitro* em razão dos custos de execução, além dos rigorosos critérios de elegibilidade, que dificultaram a composição dos grupos, especialmente o de indivíduos com periodontite. Além disso, a periodontite é uma doença que pode ter diferentes níveis de gravidade em um mesmo indivíduo e até mesmo em único dente (PAPAPANOU, et al., 2018; HINRICHS & NOVAK, 2011). Assim, um diagnóstico robusto para a classificação dos indivíduos doentes neste tipo de estudo é condição imprescindível.

Dessa maneira, pela análise dos descritores clínicos periodontais, os grupos foram bem caracterizados quanto ao diagnóstico de periodontite visto que o critério empregado para a classificação (Gomes-Filho et al., 2007) é mais específico do que sensível, ou seja, há pouca probabilidade de serem encontrados falsos positivos. Esta classificação garantiu uma maior confiabilidade dos resultados, porém reduziu a possibilidade de recrutamento de indivíduos doentes.

Em relação ao extrato metanólico da *L. thymoides*, a concentração (10%) adotada para os experimentos apresentou baixa citotoxicidade em teste com artêmia salina (3% de mortalidade na concentração de 10 μ g/ml com etanol em 72 horas e 10% na mesma concentração e tempo com DMSO), o mesmo ocorrendo no teste de

viabilidade celular. O extrato sem diluição apresentou uma concentração proteica de 3,314mg/ml, o que pode ser devido à presença de alguns produtos do metabolismo secundário da planta, como os alcaloides, ricos em triptofano e tirosina (PINTO, et al., 2013; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013). Vale salientar que diversos fatores podem influenciar na composição química da planta e na quantidade total de proteínas, a exemplo da composição do solo, época da colheita e fatores climáticos como precipitação e insolação (SILVA, 2012).

Outro achado muito importante diz respeito ao potencial antimicrobiano da planta. Seu extrato metanólico mostrou-se bactericida para os microrganismos *M. luteus* e *S. aureus* e bacteriostático para *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. Em relação aos fungos, se mostrou fungicida para *C. glabrata* e fungistático para *C. albicans*. Já foi relatado previamente que o extrato metanólico de *L. thymoides* possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida parapsilosis*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* (SILVA, et al, 2015). Esses resultados são bastante promissores no campo do tratamento de indivíduos com doenças ocasionadas por infecção por estes microrganismos, com especial relevância para aqueles imunossuprimidos, cujo sistema de defesa inato e adaptativo não consegue controlar a infecção com eficiência.

Neste sentido, a utilização do extrato de *L. thymoides*, bem como dos seus compostos, pode ser uma alternativa viável e segura no tratamento de doenças infecciosas, a exemplo da periodontite.

6 CONCLUSÃO

Pelo exposto, nota-se que a *L. thymoides* é uma planta medicinal com potencial imunomodulador e antimicrobiano, podendo ser uma fonte de novos produtos no tratamento da periodontite

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; et al. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**, Elsevier, 5. Ed. 2017.

ABBAS, A. K.; et al. **Imunologia Celular e Molecular**, Elsevier, 8. Ed. 2015.

ABRAHAM, S. et al. Quorum sensing vs quorum quenching; a communicating mechanism in periodontal pathogens and its inhibition - A Review". **International Journal of Current Research**. Vol. 10, Issue, 04, pp.67858-67863, April, 2018

ABUSLEME, L.; et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **ISME J**. 7:1016–1025, 2013.

ADLER, C. J.; et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. **Nature Genet**. 45:450–455, 2013.

ALMEIDA-DA-SILVA, C. L. C.; et al. P2X7 receptor-mediated leukocyte recruitment and Porphyromonas gingivalis clearance requires IL-1 β production and autocrine IL-1 receptor activation. **Immunobiology**. Volume 224, Issue 1, P. 50-59, 2019.

AOKI-NONAKA, Y.; et al. The Amyl-1-18 peptide derived from rice inhibits alveolar bone resorption via suppression of inflammatory cytokine production induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β in mice. **Journal of Periodontology**. Vol. 90, n. 5, 2019.

ARCHER, N. K.; et al. Staphylococcus aureus biofilms. Properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, 2(5), 445–459, 2011.

AREND, W. P.; GUTHRIDGE, C. J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. **Annals of the Rheumatic Diseases** 59: 60-64, 2000.

ARIEF, E. M.; et al. Serum interleukin-17 (IL-17) in chronic periodontitis patients. **Padjadjaran Journal of Dentistry**;29(3):138-142. 2017.

ATARASHI, K.; et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. **Science** 358(6361):359–365, 2017.

BALAJI, A.; et al. Contribution of Metagenomics Towards Identification of Oral Flora - A Review. **Indian Journal of Public Health Research & Development** . Vol. 10 Issue 4, p134-140, 2019.

BALAJI, S. K. et al. Chronic periodontitis prevalence and the inflammatory burden in a sample population from South India. **Indian Journal of Dental Research**, Vol. 29, Issue 2, 2018.

BANJAR, W.; ALSHAMMARI, M. H. Genetic factors in pathogenesis of chronic periodontitis. **Journal of Taibah University Medical Sciences** 9(3), 245e247, 2014.

BATCHELOR, P. Is periodontal disease a public health problem? Br. **Dent. J.** 217(2014) 405-409.

BATOOL, H.; et al. Salivary Levels of IL-6 and IL-17 Could Be an Indicator of Disease Severity in Patients with Calculus Associated Chronic Periodontitis. **BioMed Research International**, 1–5, 2018.

BEKLEN, A. Effects of IL-13 on TGF- β and MMP-1 in periodontitis. **Biotechnic & Histochemistry**, 1473-7760 <http://dx.doi.org/10.1080/10520295.2017.1312526>.
Published online: 06 Jul 2017.

BETELLI E. et al. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature**, London, 453: 1051-1057, 2008.

BILLINGS, M.; et al. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. **J Clin Periodontol.** 45(Suppl 20):S130–S148, 2018.

BLANDIZZI, C.; et al. Periodontal Tissue Disposition of Azithromycin in Patients Affected by Chronic Inflammatory Periodontal Diseases. **J Periodontol**, 70(9), September, 1999.

BLASCO-BAQUE, V.; et al. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. **Gut microbiota**, Volume 66, Issue 5, 2017.

BLOD, C.; et al. The oral microbiome-the relevant reservoir for acute pediatric appendicitis? **Int J Colorectal Dis** 33(2):209–218, 2017.

BRANDA, S.S.; et al. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proc Natl Acad Sci USA** **98**: 11621–11626, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Salmonella (Salmonelose): o que é, causas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/Salmonella>. Acesso em 30/04/2019.

BRITO, F. N.; et al. Proliferation of human adipose tissue-derived stem cells stimulated by oil rich in thymol of *Lippia origanoides*. **Acta Cir Bras**. v 33(5):431-438, Maio, 2018.

BROWN-LOBBINS, M. L.; et al. Chronic exposure of interleukin-13 suppress the induction of matrix metalloproteinase-1 by tumour necrosis factor α in normal and scleroderma dermal fibroblasts through protein kinase B/Akt. **Clinical & Experimental Immunology**. Volume 191, Issue 1, p. 84-95, 2018.

CALDAS, R. R.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Periodontal Pathogens in the Oral Cavity and Lungs of Cystic Fibrosis Patients: a Case-Control Study. **J Clin Microbiol** 53:1898 –1907. 2015.

CARDOSO, E. M.; et al. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. **Postgraduate Medicine** Vol 130, Issue 1, 2018.

CARDOSO, P. H.; et al. Verbenaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, 69(2): 777-786, Juiz de Fora, 2018.

CARVALHO-FILHO, P. C.; et al. Role of Porphyromonas gingivalis HmuY in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. **Mediators of Inflammation**, vol. 2016, 1-9, 2016.

CHAPPLE, I. L. C.; GENCO, R. On behalf of working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal disease: consensus report of the joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. **J Clin Periodontol**. 40(Suppl. 14): S106eS112, 2013.

CHEN, D.; et al. Association between Polymorphisms in Interleukins 4 and 13 Genes and Chronic Periodontitis in a Han Chinese Population. **BioMed Research International**, 1–7, 2016

CHEN, Y. H.; et al. Salmonella choleraesuis bacteremia in southern Taiwan. **Kaohsiung J. Med. Sci.** 15:202-208, 1999.

CHENG, W.; et al. Periodontitis-associated pathogens *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* activate human CD14⁺ monocytes leading to enhanced Th17/IL-17 responses. **European Journal of Immunology**. Vol 46, Issue 9, 2016.

CHIGASAKI, et al. A cross-sectional study on the periodontal status and prevalence of red complex periodontal pathogens in a Japanese population. **Journal of Oral Science**, Vol. 60, No. 2, 293-303, 2018.

CHIU, C. H.; et al. Predictors for extraintestinal infections of non-typhoidal Salmonella in patients without AIDS. **Int. J. Clin. Pract.** 53:161-164, 1999.

COMPADRE, C. M.; et al. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol 15, Issue 1, p. 89 – 106, January 1986.

CORDERO, A. P.; et al. Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de *Lippia alba* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Peruana de Biología**. 24(2): 211 – 216. Julho, 2017

CORTEZ, F. S. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos**. Tese (Doutorado – IPEN – USP). São Paulo, 2011.

COSTALONGA, M.; HERZBERG, M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. **Immunol Lett** 162(2 Pt A):22–38, 2014.

CUESTA, A. I.; et al. Prevalence of Staphylococcus spp. and Candida spp. in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. **Acta Odontol Latinoam** ; 23:20 – 26, 2010.

DALL'ANTONIA, M.; et al. Competition between methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* in the anterior nares. **J Hosp** ; 61:62 – 67, 2005.

DARVEAU, R. P.; Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Rev. Microbiol.** 8:481–490, 2010.

DEWHIRST, F. E.; et al. The human oral microbiome. **J Bacteriol** 192(19):5002–5017, 2010.

DIAS, C. R. S. ; et al. A Doença Periodontal Como Fator de Risco Para os Acidentes Cerebrovasculares. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, 7(3):325-329, set./dez. 2007.

DURHAM, J.; et al. Impact of periodontitis on oral health-related quality of life, **J. Dent.** 41; 370-376, 2013.

EKE, P. I.; et al. Advances in surveillance of periodontitis: the centers for disease control and prevention periodontal disease surveillance project, **J. Periodontol.** 83 1337 -1342, 2012.

FERREIRA, L. C.; et al. Análise da resposta inflamatória na progressão da periodontite experimental ao longo do tratamento com zoledronato. **Arch Health Invest** 2017;6, 2017

FERRERO-MILIANI L.; et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1² generation. Review. British Society for Immunology, **Clinical and Experimental Immunology** 147: 227–235, 2006.

FIGUEREDO, C. M. S.; et al. Expressão de citocinas relacionadas à resposta th17 nos tecidos gengival e intestinal de pacientes com periodontite e doença inflamatória intestinal. **Braz J Periodontol.** vol 27 - issue 01, 2017.

FIORILLO, L.; et al. Interferon Crevicular Fluid Profile and Correlation with Periodontal Disease and Wound Healing: A Systemic Review of Recent Data. **Int J Mol Sci.** Jul; 19(7): 1908, 2018.

FURLETTI, V. F.; et al. Susceptibility of Candida spp. oral isolates for azolic antifungals and amphotericin B. **Braz J Oral Sci.** (25):1543–9, 2008.

GAFFEN, S. L.; HAJISHENGALLIS, G. A. New Inflammatory cytokine on the Block: Re-thinking Periodontal Disease and the Th1/Th2 Paradigm in the context of Th17 cell and IL-17. **J Dent Res.** 87(9):817–28, 2008.

GAMARRA-ROJAS, C. F. L. et al. **Cheklis das plantas do Nordeste**. Disponível em <<http://www.cnip.org.br/bdnpn/checklistNE.pdf>>. Acesso em 21 de maio de 2018.

- GAO, L.; et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. **Protein Cell**. 9: 488, 2018.
- GMITEREK, A; et al. Immune response of macrophages induced by Porphyromonas gingivalis requires HmuY protein. **Immunobiology** , v. 221, p. 1382-1394, 2016.
- GIRALDO, S ; et al. IL1B (interleukin 1, beta). **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.** ;13(4):273-275, 2009.
- GOMES, E. C.; et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae). **Rev Bras Farm**, 60 (2), 103, 1993.
- GOMES, S. V. F.; et al. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclet. Quím.** Vol.36, no.1. São Paulo, 2011.
- GOMES-FILHO, I. S. Clinical diagnosis criteria for periodontal disease: an update. **Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy**, v. 9, p. 354-356, 2018.
- GOMES-FILHO, I. S.; et al. Does Periodontal Infection Have an Effect on Severe Asthma in Adults? **J. Periodontol.** Vol. 85, n. 6. June, 2014.
- GOMES-FILHO, I. S.; et al. The Association Between Postmenopausal Osteoporosis and Periodontal Disease **Journal of Periodontology**, Vol. 78, No. 9: 1731-1740, September, 2007.
- GOMES-FILHO, I. S.; et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, Issue 11, p. 957-963, 2007.
- GORDON, J. I.; KLAENHAMMER, T. R. A rendezvous with our microbes. **Proc Natl Acad Sci USA** 108 (Suppl 1):4513–4515, 2011.
- GUARNELLI, M. E.; et al. Adjunctive effect of chlorhexidine in ultrasonic instrumentation of aggressive periodontitis patients: a pilot study. **J Clin Periodontol.** 35(4):333-41, 2008.
- GUEVARA, R. et al. Vegetación pionera sobre rocas, un potencial biológico para la revegetación de áreas degradadas por la minería de hierro. **Interciencia**, v.30, n.10. Caracas, oct. 2005.

HAJISHENGALLIS, G.; Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol.** 15(1): 30–44, January, 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: The Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol. Oral Microbiol.** 27:409–419, 2012.

HAMON, M. A.; LAZAZZERA, B.A. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Mol Microbiol** 42: 1199–1209, 2001.

HAN, Y. W.; WANG, X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. **J. Dent. Res.** 92:485–491, 2013.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das Plantas Nativas Brasileiras para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos Tendo como Exemplo *Lippia Alba* (MILL.)N. E. BROWN (Verbenaceae). **Saúde, Santa Maria**, vol 33, n 1: p 43-48, 2007.

HEITZ-MAYFIELD, L. J.; LANG, N. P. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. **Periodontol** ; 53:167 – 181, 2010.

HIENZ, S. A.; et al. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research*, Vol. 2015, 1–10, 2015.

HINRICHS, J. H.; NOVAK, M. J. **Classificação das Doenças e Condições que Afetam o Periodonto.** In: Carranza, *Periodontia Clínica* / [editores] Michael G. Newman, Henry H. Takei e Perry R. Klokkevold ; editor emérito Fermin A. Carranza ; [tradução Débora Rodrigues Fonseca... et al.]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.1328p.

HUANG, Y.-K.; et al. Pathogenicity differences of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Choleraesuis-specific virulence plasmids and clinical *S. Choleraesuis* strains with large plasmids to the human THP-1 cell death. **Microbial Pathogenesis**, 128, 69–74, 2019.

HUJOEL, P. **Fundamentos nos Métodos de Epidemiologia da Doença Periodontal.** In: Carranza, *Periodontia Clínica* / [editores] Michael G. Newman, Henry H. Takei e Perry R. Klokkevold ; editor emérito Fermin A. Carranza ; [tradução Débora Rodrigues Fonseca... et al.]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.1328p.

ISAZA-GUZMÁN, D. M.; et al. Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis. **ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY**, 60(1), 91–99, 2015.

IYER, A.; et al. Salmonella among humans of Asian countries. *Life Science Journal*. 15(3), 2018.

JORTH, P.; et al Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. **MBio** 5(2):e01012–e01014, 2014

JUDD, W. et al. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. 3rd ed. Sunderland, UK, Sinauer, 2008.

JUIZ, P. J. L., **Atividade Apoptótica sobre Osteoclastos, Antimicrobiana e Antitumoral de Plantas Medicinais Cultivadas no Recôncavo Baiano**. Tese (Doutorado -Área de concentração: Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2013.

KARIMBUX, N. Y.; et al. Interleukine-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**. 83: 1407-1419, 2012.

KARIU, T.; et al. A natural anti-periodontitis agent, epimedokoreanin B, inhibits virulence activities of gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. Vol. 3, Issue 7, 2019.

KEBSCHULL, M.; et al. "Gum bug leave my heart alone": Epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. **J. Dent. Res**. 89:879–902, 2010.

KLUYTMANS, J.; et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. **Clin Microbiol Rev** ; 10:505 – 520,1997.

KOGA-ITO, C. Y.; et al. Phenotypic characterization of *Candida* spp. isolates from chronic periodontitis patients Brazilian. **Braz J Oral Sci**. 7(25):1531-4, 2008.

KOOK, K. E.; et al. Inhibitory Effect of Standardized Curcuma xanthorrhiza Supercritical Extract on LPS-Induced Periodontitis in Rats. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 27, n. 11, 2017.

KUCZYNSKI, J.; et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. **Nat Rev Genet** 13(1):47–58, 2012.

LAINE, M. L.; et al.. Genetic susceptibility to periodontitis. **Periodontology**. 58: 37-68, 2012.

LESTER, S.R.; et al. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. **J Periodontol**. 78(8):1545-50; Aug 2007.

LINDHE, J. ; et al. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral** [tradução Edson Jorge Lima Moreira] 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LING, Z.; et al. Decreased diversity of the oral microbiota of patients with Hepatitis B virus-induced chronic liver disease: a pilot project. **Sci Rep** 5:17098, 2015.

LINHARTOVA, P. B. et al. Interleukin-1 Gene Variability and Plasma Levels in Czech Patients with Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus. **Journal of Dentistry**, 2019, 1–10, 2019.

LIRAJUNIOR, R.; BOSTRÖM, E. A. Oral-gut connection: one step closer to an integrated view of the gastrointestinal tract? **Mucosal Immunol**. 11, p. 316–318, 2018.

LIU, B.; et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. **PLoS ONE** 7(6):e37919, 2012.

LO, H. Y.; et al. Changes in epidemiology and antimicrobial susceptibility of nontyphoid Salmonella in children in southern Taiwan, 1997–2016. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. 1-7, 2018.

LOPES, P. R. O.; et al. Extração supercrítica e por arraste-de-vapor dos óleos essenciais das folhas de *Lippia microphyla* Cham. e *Lippia thymoides* Mart. & Schauer. In: 28ª REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 2005, Poços de Caldas. **Livro de Resumos da 28ª Reunião Anual da SBQ**. Poços de Caldas: SBQ, 2005.

LOPES, P. R. O. **Extração Supercrítica de Óleos Essenciais do Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2004.

LUCCHESI, A. M.; et al. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do Semi-árido baiano. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 2006, Águas de Lindoia. **Livro de resumos da 29ª Reunião Anual da SBQ**. São Paulo: SBQ, 2006.

MACEDO, F. R.; et al. Associação entre periodontite e doença pulmonar. **RGO**, Porto Alegre, v. 58, n. 1, p. 47-53, jan./ mar. 2010.

MAEKAWA, T.; et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. **Cell Host Microbe**. 15(6): p.768–778, 2014.

MAJUMDER, P.; et al. Interleukin gene polymorphisms in chronic periodontitis: A case-control study in the Indian population. **Archives of Oral Biology**. Vol. 101, p. 156-164, 2019.

MAGALHÃES, A. O. **Isolamento e identificação de substâncias com ação espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* Mart & Schauer (Verbenaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

MARION, J. J. C.; et al. Análise da contaminação em cones de papel absorvente e sua influência no tratamento endodôntico. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** vol. 68 no.4 Sao Paulo Out./Dez. 2014.

MAYER, G. **Imunologia – Cap. Treze: Citocinas e Imunoregulação**. Tradução por HOPKINS, M. <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter13.htm>. Acesso em 23 de setembro de 2017.

MERCADO, N.; et al. **Application of Nanoparticles in Treating Periodontitis: Preclinical and Clinical Overview**. In: Pathak, Y. V. (Ed.). (2019). Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery, p. 467-480, 2019.

MESA-ARANGO, A. C.; et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(6): 878-884, September 2009.

MESSORA, M. R.; et al. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. **Archives of Oral Biology**, 66, 108–119, 2016.

MEYER, B. N.; et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis, **Periodontol.** 2000 69; 7-17, 2015.

MIRANDA, P. M. ;et al. Humoral Immunity in the Context of the Relationship between Periodontitis and Severe Asthma - Literature Review. **EC Dental Science**, v. 18, p. 82-90, 2019.

MOORE, K. W.; et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** ;19:683–765, 2001.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev.** Dec;226:205–18, 2008.

MOTA, A. P. P.; et al. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ciência Rural**, v.48:06. Santa Maria, Junho, 2018.

MOULTON, R. V., Chapter 17 – Cytokines. In: TSOKOS, G. C. (Org). **Systemic Lupus Erythematosus - Basic, Applied and Clinical Aspects**. Elsevier, 640 p. 2016.

MOSZER, I.; et al. SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. **Nucleic Acids Res** 30: 62–65, 2002.

MUHLEBACH, M. S.; et al. Association between mannan-binding lectin and impaired lung function in cystic fibrosis may be age-dependent. **Clin Exp Immunol** 145:302–307, 2006.

- MURPHY, K. et al. **Janeway's Immunobiology**. 9. ed., New York: LCC, 2016.
- MURRAY, P. R.; et al. **Enterobacteriaceae**. In: *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. cap. 29, p. 252, 2002.
- MUTHULAR, M.; et al. Effects of tamoxifen on periodontal disease and *Candida albicans* of patients with breast cancer and other pathologies. **Future Microbiology**. Vol. 14, n. 2, 2019.
- NIEDZIELSKA I.; CIERPKA S. Interferon gamma in the etiology of atherosclerosis and periodontitis. **Thromb. Res**. 126:324–327; 2010.
- OCAZIONES, R. E.; et al. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 105(3): 304-309, May 2010.
- O'GARRA, A.; et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunol Rev**. 223:114–31; 2008.
- OLADIMEJI, F. A.; et al. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 72, Issues 1–2, p. 305-311. September, 2000.
- OLIVEIRA, A. C.; et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 101(5):493-7, 2006.
- OLIVEIRA, A. L. S.; et al. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer. **XVI SEMIC – Anais**. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, p 864 – 867, 2012.
- OLIVEIRA, A. R. M. F. **Morfoanatomia, Composição Química e Atividade Biológica do Óleo Essencial de Espécies Nativas de *lippia***. Tese (Doutorado -Área de concentração: Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2014.
- OLIVEIRA, D. R.; et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**. Vol. 101, Issue 1, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 108 p. 103–108, 2006.

OLSEN, I.; et al. *Porphyromonas gingivalis* disturbs host–commensal homeostasis by changing complement function. **Journal of Oral Microbiology**, Vol. 9(1), 2017.

O'SHEA, J. J.; et al. **Cytokines and cytokine receptors**. Clinical Immunology (Fourth Edition), p. 108-135, Elsevier, 2013.

OUKKA, M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 66, p. 87-90, 2007.

PAGE, C. R.; EKE, P. I. Case Definitions for Use in Population-Based Surveillance of Periodontitis. **J Periodontol**. (Suppl.) Volume 78 • Number 7, July, 2007.

PAPAPANOU, N. P.; et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol**. ;89(Suppl 1):S173–S182, 2018.

PASCUAL, M. E.; et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 76, Issue 3, p. 201-214. Aug, 2001.

PEDROSA, R. C. **Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT**. Disponível em: [<http://ppgbqa.ufsc.br/files/2011/06/protocolo-MTT.docx>]. Acesso em 03.02.2018.

PESTKA S.; et al.. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunol Rev**, 202:8–32, 2004.

PETEAN, I. B. F.; et al. Genetic Polymorphisms in RANK and RANKL are Associated with Persistent Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics** Volume 45, Issue 5, Pages 526-531, 2019.

PETERS, B.A.; et al. Oral Microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers. **Cancer Res** 77(23):6777–6787, 2017.

PINTO, C. D. P., et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-5, 2013.

PINTO, C. P.; et al. Atividade Antimicrobiana de óleos essenciais de *Lippia thymoides* (Verbenaceae). In: XIX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Salvador, 2006. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Salvador, 2006.

PLAZA-DÍAZ J.; et al. Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. **Nutrients**, vol. 10, Issue 1, 2018.

PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **J Clin Periodontol**. 38 Suppl 1:60–84, 2011.

REDDY, R. M; et al. Increased variance in oral and gastric microbiome correlates with esophagectomy anastomotic leak. **Ann Thorac Surg** 105(3):865–870, 2018.

REYNAUD A. H.; et al. Yeasts in periodontal pockets. **J. Clin. Periodontol**. 28(9), 860–864, 2001.

RÍOS, N; et al. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n 61, 307–311,dez, 2017.

RODRIGUES, V. D.; et al. Atividade Antimicrobiana de *Lippia thymoides*. **III Seminário de Resistência Bacteriana e II Seminário de Resistência Microbiana – Anais**. Salvador, p 18, 2008.

ROMANO, F.; et al. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of generalized aggressive periodontitis patients after non-surgical periodontal treatment. **Clinical Oral Investigations**, 22(2), 1083–1092, 2018.

ROSIER, B. T.; et al. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? **Front Cell Infect. Microbiol.** 4; 2014.

SAIKALY, S. S. Recurrent aphthous ulceration: a review of potential causes and novel treatments. **J Dermatol Treat**, 2018.

RUBIO, N. A., et al. Invasión fungica en tejido conectivo en pacientes con enfermedad gingivo-periodontal. **Rev. Iberoam. Micol.** 32(1), 20–24, 2015.

ROSZYK, E.; PUSZCZEWICZ, M. Role of human microbiome and selected bacterial infections in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Reumatologia** 55(5):242–250, 2017.

RYBTKE, M.; et al. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **Journal of Molecular Biology**, 427(23), 3628–3645, 2015.

SALAZAR, M.G.; et al. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. **J Clin Periodontol** 40: 825–832, 2013.

SALIMENA, F .R. G. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 232-234, 2010.

SANTOS; et al. Diterpenos, casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quím. Nova**, vol.31, n 3. São Paulo, 2008.

SANTOS-LIMA, E. K. N.; et al., Production of interferon-gamma, interleukin-6, and interleukin-1 β by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with novel lys-gingipain synthetic peptides. **J Periodontol.** 00:1–9, 2019.

SCHELLER, J; et al. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. **Scand J Immunol.** 63:321–9; 2006.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; et al. Th17 cells in the big picture of immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 120, n. 2, p. 247-254, 2007.

SELLON, R. K.; et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun.** Nov;66(11):5224–31,1998.

SHEBERT, G. V. **Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy**, Elsevier, 368 p., 2011.

SILVA, F.S.; et al. Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2015, Article ID 463248, 10p., 2015.

SILVA, F.S. **Estudo Fitoquímico e Farmacológico de *Lippia thymoides* MART. & SCHAUER (verbenaceae)**. Tese (Doutorado -Área de concentração: Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2012.

SILVA, I; et al. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Editora Educativa; 100p., 1995.

SIQUEIRA, A. B. S.; et al. Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Braz. oral res.** vol.29 no.1 São Paulo, 2015.

SOARES, B. V., TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia.** 3(1):109-123, 2013.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol.** 2000. 38:135–187, 2005.

SOKOS, D.; et al. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. **Journal of Periodontal Research**, 50(2), 152–159, 2014.

SOLBIATI, J.; FRIAS-LOPEZ, J. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. **Journal of Dental Research**. Vol 97, Issue 5, 2018

SOMMER, M. E. L.; et al. Immune response mediated by Th1 / IL-17 / caspase-9 promotes evolution of periodontal disease. **Archives of Oral Biology**, Volume 97, Pages 77-84, 2019.

SORSA, T.; et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. **Periodontology 2000**, 70(1), 142–163, 2015.

SORSA T.; et al. Matrix metallopro-teinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. **Ann Med** 38: 306–321, 2006.

SOUTO, R.; et al. Prevalência de bactérias patogênicas "não-orais" no biofilme dental subgingival de pacientes com periodontite crônica. **Braz. J. Microbiol.** [online]. vol.37, n.3, pp.208-215, 2006.

SUGIMOTO, R.; et al. Neck abscess due to Salmonella Choleraesuis: case study and literature review. **JMM Case Rep**. 4(8), 2017.

TAK, W. M.; SAUNDERS, M. E. **The Immune Response: Basic and Clinical Principles**, p. 463-516, Elsevier, 2006.

TAYLOR, S.; HENNEKENS, C. H. Interrelationships of Periodontal Disease, Systemic Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Ann Dentist Oral Disord**. 2:108, 2018.

TAYLOR, C. J.; et al. Bacterial reservoirs in cystic fibrosis. **Arch Dis Child** 65:175–177, 1990.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae): A Literature Review. **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 8, Issue 5, 1996.

THIELE, S.; et al. Recent advances in periodontitis, a prototypic osteo-immunological disease. **J Lab Precis Med** 3:101, 2018.

THORBERT-MROS, S.; et al. Interleukin-17 producing T cells and interleukin-17 mRNA expression in periodontitis and longstanding gingivitis lesions. **Journal of Periodontology**. Vol. 90, Issue 5, 2019.

TOKER, H.; et al. The effects of IL-10 gene polymorphism on serum, and gingival crevicular fluid levels of IL-6 and IL-10 in chronic periodontitis. **J. Appl. Oral Sci.** vol. 26 Bauru, 2018

TRINDADE, S. C.; et al. *Porphyromonas gingivalis* HmuY-Induced Production of Interleukin-6 and IL-6 Polymorphism in Chronic Periodontitis. **J. of Periodont.** Vol. 84, No. 5, Pages 650-655. May, 2013.

TRINDADE, S. C.; et al. Induction of interleukin(IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. **J. Periodontal Res.** Feb;47(1):27-32, 2012.

TRINDADE, S. C.; et al. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 10, p. 50-58, 2008.

TSUBURA, S.; et al. The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 28: 1353, 2009.

TUNES, U. R. **Estudo da infecção e resposta imune a *Porphyromonas gingivalis* e do perfil imunogenético em mestiços brasileiros portadores de periodontite crônica**. Tese (Doutorado – área de concentração: Imunologia), Universidade Federal da Bahia, 2006.

VALENTIN, A; et al. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *lippia multiflora*. **Phytochemistry**. Vol. 40, Issue 5, p. 1439-1442. November, 1995.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: Revisão. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** ; 24(4):146-154, 2001.

VERNAL, R.; et al. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 32(4):383-9; Apr 2005.

WASFI, R.; et al. Probiotic Lactobacillus sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing Streptococcus mutans. **J Cell Mol Med** 22(3):1972–1983, 2018

ZARCO, M. F.; et al. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. **Oral Dis** 18(2):109–120, 2012.

ZHANG, Q.; et al. Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. **Journal list. Biomed research international**. Vol 2014. 2014.

ZHANG, W.; et al. IL-13 -1112 polymorphism and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. **BMC Oral Health**, 18(1), 2018.

8 APÊNDICES

8.1 APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS NATIVAS DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO NA PERIODONTITE CRÔNICA.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Soraya Castro Trindade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para ser lido para/por todos os participantes do estudo

As informações a seguir descrevem o estudo e os seus direitos como participante. Além do que for aqui esclarecido, o entrevistador poderá responder qualquer questão que

você tenha referente ao estudo. Por favor, leia ou ouça com atenção e, sempre que achar necessário, interrompa para perguntar.

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Avaliação do efeito imunomodulador de extratos e óleos essenciais de plantas nativas da região do semiárido baiano na periodontite crônica”. Antes de decidir participar, é importante que você entenda o porquê da realização desta pesquisa e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e, se preferir, converse com seus familiares, amigos ou com seu médico. Se você desejar, pode levar este material para casa para pensar melhor. Pergunte-nos se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

A Periodontite é uma doença que se caracteriza por uma inflamação do osso que envolve os dentes, levando à perda dos dentes, ao mau hálito e ao comprometimento da saúde geral do doente. O estudo das células e moléculas envolvidas no processo inflamatório é importante para compreender melhor a atividade dessa doença e seus fatores de risco. Os resultados desta pesquisa nos ajudarão a ter uma melhor compreensão da Periodontite e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a esse tema, inclusive influenciando na forma de prevenir e tratar a doença aqui estudada.

O objetivo desse estudo é avaliar a ação dos extratos de algumas espécies vegetais - manjeriço (*Ocimum basilicum*), salva-de-marajó (*Lippia origanoides*), alecrim do campo (*Lippia thymoides*), *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, erva cidreira (*Lippia alba*), alecrim-de-tabuleiro (*Hyptis fruticosa*), *Hyptis leucocephala* e alfavaca branca (*Hyptis macrostachys*) e das raízes das cactáceas mandacaru (*Cereus jamacaru*), quipá-de espinho (*Tacinga palmadora*), rabo de raposa (*Harrisia adscendens*) e figueira da Índia (*Opuntia ficus*) sobre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas, de pacientes com e sem periodontite.

Com isso, buscamos dados que contribuam para a compreensão da influência do extrato dessas plantas no tratamento da Periodontite, bem como para o entendimento dos mecanismos de resposta do homem diante da infecção por esse micro-organismo.

Para tanto, serão realizados a) preenchimento de questionário com perguntas sobre sua saúde e seus hábitos de higiene da boca; b) exame bucal, realizado por um (a) dentista, utilizando instrumentos apropriados para avaliar a gengiva; e c) coleta de uma amostra de sangue do seu braço (exame de sangue comum), realizada por um (a) dentista capacitado (a) e treinado (a) para a coleta.

Durante o questionário de saúde, caso seja identificada alguma doença sistêmica, como hipertensão, diabetes ou distúrbio de coagulação; você não participará das etapas seguintes da pesquisa, mas continuará sendo atendido nas atividades de extensão do curso de Odontologia da UEFS.

Os exames bucais que serão realizados são exames rotineiramente efetuados por dentistas em consultórios ou serviços odontológicos. Todo o material coletado será, depois de feitos os exames necessários para este projeto, jogado fora. Solicitamos aqui a sua autorização para coleta e utilização do seu sangue durante o período desta pesquisa.

Durante a coleta de sangue do seu braço, você poderá sentir dor. A intensidade da dor varia entre cada indivíduo, porém é uma dor suportável. Quanto mais tranquilo (a) você estiver, menos doloroso será o procedimento.

Após a coleta, pode-se formar um hematoma (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o (a) dentista que realizará a coleta dispõe de meios para contornar esses efeitos

indesejáveis. Faça perguntas sobre essas complicações para o (a) profissional a fim de se tranquilizar.

Participando desta pesquisa, você não receberá nenhum tipo de benefício material, como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os dentistas envolvidos na pesquisa, juntamente com os estudantes de Odontologia que ajudarão no projeto, realizarão o seu tratamento periodontal.

A divulgação dos resultados da pesquisa para os participantes voluntários será feita por meio de palestras agendadas previamente, a serem realizadas na sala de espera, antes do atendimento odontológico. Se você já tiver concluído o tratamento, será convidado (a) por telefone a comparecer na data indicada, na qual será também realizada uma revisão da sua saúde bucal, por meio do exame clínico periodontal, acompanhada de terapia de manutenção, caso necessária.

Os resultados dessa pesquisa podem ajudar no desenvolvimento, pelos serviços públicos de saúde, de ações voltadas para prevenção da Periodontite; as quais trarão benefícios futuros para você, sua família e sua comunidade.

Vale ressaltar que, a qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que serão respondidas. Tem a liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si, podendo entrar em contato com os pesquisadores desta pesquisa para pedir que os seus dados sejam retirados da mesma, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento em qualquer das atividades de extensão do curso de Odontologia da UEFS.

Os dados obtidos neste estudo, bem como fotografias que possam ser tiradas, serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e serão publicados em revistas especializadas. No entanto, a sua identidade nunca será revelada e seu rosto nunca será mostrado nas fotografias, apenas sua boca.

Caso ocorram danos à saúde causados diretamente pela pesquisa, o participante tem direito a indenização, o procedimento será interrompido e os pesquisadores farão os encaminhamentos necessários. Nenhum custo será cobrado a você, pois será coberto pelo orçamento da pesquisa. Vale ressaltar que o risco de danos causados pela sua participação na pesquisa é baixo, pois serão realizados procedimentos de Odontologia que já seriam realizados na sua avaliação clínica. Da mesma forma, a coleta do seu sangue é semelhante àquela realizada quando você faz exame de sangue no laboratório.

Para o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto, você pode entrar em contato com o pesquisador, ligando para (75) 3161.8112 (NUPPIIM- UEFS).

Estando de acordo, assinam:

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Local e Data: _____

Pesquisadora responsável: Soraya Castro Trindade.
NUPPIIM - UEFS. Campus Universitário, Feira de Santana - Bahia.
BR-116, quilômetro 3, avenida Universitária, sem número.

ATENÇÃO: a sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de denúncia pelo não cumprimento do que foi acordado ligue (75) 3161. 8067 (CEP-UEFS).

1ª via do participante da pesquisa

2ª via da pesquisadora responsável

8.2. APÊNDICE B – FICHA DE ANAMNESE

Ficha de anamnese

INFORMAÇÕES GERAIS

Número do cadastro do paciente:										
Endereço:										
Telefone:										
Data de nascimento:			Idade:			Sexo:				
Ocupação atual:					Local de trabalho:					
Ocupação anterior:					Tempo de atividade:					
HÁBITOS DE VIDA										
Fumo	Sim		Não		Tip o		Nº cigarros/dia		Meses	
Álcool	Sim		Não		Tip o				Anos	
Drogas	Sim		Não		Tip o					

ANTECEDENTES MÉDICOS

Alergias	Sim		Não		Tip o				Anos	
Anemia	Sim		Não		Tip o				Anos	
Hipertensão arterial	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Hipotensão Arterial	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Válvulas Artificiais	Sim		Não		Tip o					
Problemas Valvares	Sim		Não		Tip o					
Endocardite Bacteriana	Sim		Não							
Ponte Safena	Sim		Não							
Infarto do Miocárdio	Sim		Não							
Marcapasso	Sim		Não		Anos					
Angina	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Diabete Tipo I	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Diabete Tipo II	Sim		Não		Compensada	Sim		Não	Ano s	
Hepatite	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Epilepsia	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	

Distúrbio de coagulação	Sim		Não		Compensado	Sim		Não	Anos	
Leucemia	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Tuberculose	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Arteriosclerose	Sim		Não		Compensada	Sim		Não	Anos	
Osteoporose	Sim		Não		Compensada	Sim			Não	
Portador HIV	Sim		Não		Em Tratamento	Sim			Não	
Portador HTLV	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Nã o	Anos	
Neoplasias	Sim		Não		Em Tratamento	Sim			Não	
Radioterapia	Sim		Não		Em Tratamento	Sim			Não	
Transplantado	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Nã o	Anos	
Leishmaniose	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Nã o	Anos	
Equistossomose	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Nã o	Anos	
Hipetireoidismo	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Nã o	Anos	
Hipotiroidismo	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Nã o	Anos	

Lupus eritematoso	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não		Anos
Artrite Reumatóide	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não		Anos
Febre Reumática	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não		Anos
Doença de Crhon	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não		Anos
Colite Ulcerativa	Sim		Não		Em Tratamento	Sim		Não		Anos
Malária	Sim		Não		Em Tratamento	Sim				Não
Herpes	Sim		Não		Em Tratamento	Sim				Não
Já se submeteu a alguma destas cirurgias?										
Amigdalectomia	Sim		Não		Anos					
Adenoidectomia	Sim		Não		Anos					
Apendicectomia	Sim		Não		Anos					
Esplenectomia	Sim		Não		Anos					
Já fez uso destes medicamentos pelo menos um mês/ano. Se sim, qual a idade de início e qual a duração do uso?										
Fenilbutazona	Sim		Não		Idade- anos			Duração- anos		
Corticóide	Sim		Não		Idade- anos			Duração- anos		
Indometacina	Sim		Não		Idade- anos			Duração- anos		
Cloranfenicol	Sim		Não		Idade- anos			Duração- anos		
munossupressor	Sim		Não		Idade- anos			Duração- anos		

Amoxicilina	Sim		Não		Idade- anos		Duração- anos	
Metronidazol	Sim		Não		Idade- anos		Duração- anos	
Hormônios	Sim		Não		Idade- anos		Duração- anos	
Última vez que foi ao Dentista				O que realizou?				
Já fez Tratamento Periodontal?	Sim		Não		Em Tratament o	Sim		Não
Já fez Tratamento Ortodôntico?	Sim		Não		Em Tratament o	Sim		Não
Família com Doença Periodontal	Sim		Não					

HÁBITOS DE HIGIENE ORAL

Quantas vezes escova seus dentes ao dia?	1 vez		2 vezes		3 veze s ou +		
Além da escova, usa outro tipo de instrumento para limpar os dentes?	Fio		Palito		Escova interde ntal	Escova bitufo	Bochec hos
O que você acha da sua condição bucal?	Ótima		Boa		Ruim		Não está preocupado com ela

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Entrevistador:

8.3. APÊNDICE C – PERIOGRAMA

FICHA DE COLETA DE DADOS PERIODONTAIS

Nº _____

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

DENTE	IR-H			Profundidade de Sondagem									Índice de Sangramento									NIC			IP				
	disto-v	medio-v	mesio-v	disto-l	medio-l	mesio-l	disto-v	medio-v	mesio-v	disto-l	medio-l	mesio-l	disto-v	medio-v	mesio-v	disto-l	medio-l	mesio-l	disto-v	medio-v	mesio-v	disto-l	medio-l	mesio-l	V	L	M	D	
18																													
17																													
16																													
15																													
14																													
13																													
12																													
11																													
21																													
22																													
23																													
24																													
25																													
26																													
27																													
28																													
29																													
37																													
36																													
35																													
34																													
33																													
32																													
31																													
41																													
42																													
43																													
44																													
45																													
46																													
47																													
48																													

Nomenclatura dentária segundo o sistema FDI

Nota: A aproximação da idade segue o seguinte critério: até 6 meses aproxima para a idade anterior; acima de 6 meses aproxima para a idade seguinte.
 IR: índice de mobilidade: 1=grau 1; 2=grau 2; 3=grau 3
 IR-H: índice de recuo ou hiperplasia (mm)
 Profundidade de sondagem nas faces vestibular e lingual (mm)
 Índice de sangramento nas faces vestibular e lingual: 0=ausente; 1=presente
 NIC: nível de inserção clínica nas faces vestibular e lingual (mm)
 QMC: quantidade de placa corada nas faces vestibular e lingual (mm)
 IP: índice de placa nas faces vestibular, lingual, mesial e distal: 0=ausente; 1=presente

8.4. APÊNDICE D – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

Submitted to Journal of Natural Products

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Immunomodulatory effect of the *Lippia thymoides* extract in periodontitis

Journal:	<i>Journal of Natural Products</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pereira-Filho, Jurandi; UEFS, Biology Lucchese, Angelica; UEFS, Biology Oliveira, Thais; UEFS, Biology Bulhosa, Rebeca; UEFS, Biology Magalhães, Acsa; UEFS, Biology Trindade, Soraya; UEFS, Biology

SCHOLARONE™
Manuscripts

ACS Paragon Plus Environment

Immunomodulatory effect of the *Lippia thymoides* extract in periodontitis

Jurandi Nery Pereira-Filho, Angélica Lucchese, Thaís Brito, Rebecca Bulhosa, Acsa Oliveira Magalhães, Soraya Castro Trindade

ABSTRACT

Periodontitis is a disease whose primary etiological factor is the presence of biofilm on the dental surface. The host's response has a preponderant role in its onset and development. The use of chemical adjuvants for the control of periodontitis has also been advocated in several forms of administration. The use of herbal remedies for this purpose is very restricted. *Lippia thymoides* is a plant used in folk medicine. This study evaluated the immunomodulatory activity of the extracts of this plant through the cultivation of whole blood of volunteers with and without periodontitis. Cells will be cultured for 48 hours in the presence of the compounds and the cytokine levels IL-13, IFN- γ , IL10, IL-17 and IL-1 β will be measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that *L. thymoides* is a medicinal plant with immunomodulatory potential, being able to be a source of new products in the treatment of chronic periodontitis.

KEYWORDS

Lippia thymoides, cytokines, extracts, immunomodulation

Introduction

Periodontitis is one of the most common affections of the of the oral cavity, which results of the imbalance between the presence of the dental subgingival biofilm and the host response (MEYLE & CHAPPLE, 2015; TRINDADE et al., 2013; EKE, et al., 2012). The main consequence of the disease is tooth loss, leading to aesthetic, functional, phonetic and emotional disturbs (LINDHE, 2005). In addition, it has been reported an association between periodontitis and other injuries, such as stroke (DIAS et al 2007), cardiovascular diseases and pulmonary disorders (TRINDADE, et al., 2019; TAYLOR & HENNEKENS, 2018; GOMES-FILHO et al., 2014).

The treatment of periodontitis consists scaling and root planning often aided using systemic antimicrobials such as amoxicillin and metronidazole or in the form of mouthwashes such as 0.12% chlorhexidine digluconate. It is known that the use of antibiotics and chlorhexidine has presented numerous disadvantages and collateral effects. Thus, alternative approaches have been sought for the prevention and control of periodontal diseases. On the other hand, some plants have been reported as a viable alternative due to their anti-

1
2
3 inflammatory activities (NILE et al, 2018; RIBEIRO et al. 2018). However, the
4 aim of this study was to evaluate the immunomodulatory activity of the *Lippia*
5 *thymoides* extract by inducing or inhibiting cytokines *in vitro* production by
6 human peripheral blood cells.
7
8

9 **MATERIAL AND MÉTHODS**

10 **Plant extract obtaining**

11
12
13 The methanol extract from the leaves of *Lippia thymoides* Mart &
14 Schauer was supplied by the Laboratory of Chemistry of Natural and Bioactive
15 Products (LAPRON) of the Feira de Santana State University (UEFS). Shortly,
16 the vegetable material was collected in november, 2015, in the collection of
17 medicinal and Aromatic Plants of the Horto Florestal Experimental Unit. An
18 exsiccate of the species from this collection has been deposited in the UEFS
19 Herbarium, under registration number 241404. The extract was produced by
20 maceration of dry leaves in methanol, which was concentrated in rotational
21 evaporator under reduced pressure and at a temperature between 40 ° and 45 °
22 C. The residual solvent was removed by evaporation (MAGALHÃES, 2018).
23
24
25
26

27 **Bacterial extract obtaining**

28
29 The immunogenic extract of *P. gingivalis* was produced according to the
30 protocol standardized by Trindade et al. (2008).
31
32

33 **Participants**

34
35 The participants (18 years or older) were recruited from the School of
36 Dentistry of Feira de Santana State University, located in Feira de Santana city,
37 Bahia-Brazil, from April, 2017 to November, 2018. The inclusion criteria
38 included systemic diseases, pregnancy, previous periodontal treatment, current
39 or previous smoking habit, antibiotic or antiinflammatory use six or two months
40 prior to collection date. This study was approved by the Feira de Santana State
41 University Institutional Review Board (Nº1.344.223) and all volunteers signed
42 the free and informed consent form.
43
44
45
46

47 **Disease Classification**

48
49 A dentist (J.N.P.F.) was trained in the calibration process for periodontal
50 examination (kappa interexaminer agreement value = 0.932) using a Williams
51 periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). The following clinical
52 parameters were evaluated: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL),
53 and bleeding on probing (BOP).
54
55

56
57 Participants were diagnosed as having periodontitis (P group) if they had
58 at least four teeth with at least one site with a probing depth greater than or
59 equal to 4mm, clinical attachment loss of 3mm or more, and bleeding on
60

1
2
3 probing at the same site (GOMES-FILHO et al., 2007). Those participants who
4 did not meet these criteria were considered not to have periodontitis (NP
5 group).
6

7 8 **Blood Collection and Cell Culture**

9
10 Peripheral blood was collected from each participant by venipuncture
11 using heparinized tubes (Vacutainer-BD, SP, Brazil) and distributed in a 24-well
12 flat bottom plate (1mL/well). The blood cells were incubated with 1,74 µg/mL of
13 *P. gingivalis* extract, with 10 µg/mL of *L. thymoides* extract, or with both extract
14 together. In addition, one well for each volunteer was incubated in the absence
15 of the antigens (unstimulated cells) or in the presence of 5 µg/mL of pokeweed
16 mitogen (PWM). After 48h-incubation under 5% CO₂ in humid conditions for 48h
17 at 37°C, supernatants were obtained by centrifugation.
18
19

20 21 **Cytokine quantification**

22
23 The concentration of IL-1β, IL-13, IFN-γ, IL-10 and IL-17 in the culture
24 supernatants were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
25 in accordance with the manufacturer's instructions (Biolegend ELISA MAX™
26 Standard Set, San Diego, CA - USA) using 96-well high-adsorption
27 immunoassay plates (COSTAR, Corning Life Science, Tewksbury, MA, EUA).
28 The optical density (OD) was verified in an ELISA reader (ELx 800 – Bio-Tek)
29 with a wavelength of 450nm.
30
31

32 33 **Data Analysis**

34
35 The normality of the data was evaluated by Kolmogorov-Smirnov test.
36 The comparison of the groups P and NP was performed using bivariate
37 analysis. The covariable age was compared using T Student test. The
38 comparison of the covariables gender, clinical parameters, as well as the
39 cytokines quantification, were evaluated using the Mann-Whitney test.
40
41

42
43 The comparison of the cytokine levels among the stimuli conditions
44 employed in the culture (unstimulated cells, PWM, *P. gingivalis* extract, *L.*
45 *thymoides* extract and *P. gingivalis* extract plus *L. thymoides* extract) was
46 realized using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, followed by
47 Bonferroni's correction.
48
49

50
51 All analysis was performed using SPSS v.22 considering a 95%
52 significance level.
53

54 55 **RESULTS**

56
57 About 150 individuals were invited to participate in the present study.
58 Excluding those who refused and who did not meet the eligibility criteria, 58
59 were included. The P group was composed by 17 individuals (29.31%) with
60

periodontitis and the NP group was composed by 41 individuals (70.69%) without the disease. As can be observed in the table 1, the mean age of the P group was 43.18 ± 11.01 years vs 38.44 ± 12.81 years of the NP group. It was not observed statistically significant differences in the age ($P=0.165$) and number of teeth in the mouth ($P=0.450$), showing homogeneity in relation to these covariable. However, the difference in gender was statistically significant ($P=0.012$).

Individuals of the P group had the worse periodontal status with higher rates of BP ($P=0.001$), $PD \geq 4\text{mm}$ ($P=0.000$) and $CAL \geq 3\text{mm}$ ($P=0.000$) than individuals of the NP group (Table 1).

Table 1: Clinical findings of periodontitis (P) and nonperiodontitis (NP) groups.

Clinical parameters	Periodontitis Classification (Gomes-Filho et al, 2007)		P
	P Group N=17	NP group N=41	
Number of teeth			
Median (IQ)	22,00	24,00	0,450**
Age			
Mean \pm SD	$43,18 \pm 11,01$	$38,44 \pm 12,81$	0,165*
Percentual of sites with BOP			
Median (IQ)	45,65(28,56-69,78)	9,52(3,67-32,41)	0,001**
Percentual of sites with $CAL \geq 3\text{mm}$			
Median (IQ)	51,85(15,06-76,06)	7,63(2,15-18,67)	0,000**
Percentual of sites with $PD \geq 4\text{mm}$			
Median (IQ)	16,66(8,27-38,48)	0,0(0,0-3,67)	0,000**
Gender	N %	N %	
Male	10 (58,8%)	10 (24,4%)	0,012***
Female	7 (41,2%)	31 (75,6%)	

P= valor de nível de significância $\geq 0,05$; * T de Student, ** Teste Mann-Whitney, *** Teste Qui-square
SD: standard deviation; BOP: bleeding on probing; CAL: clinical attachment level; PD: probing depth.

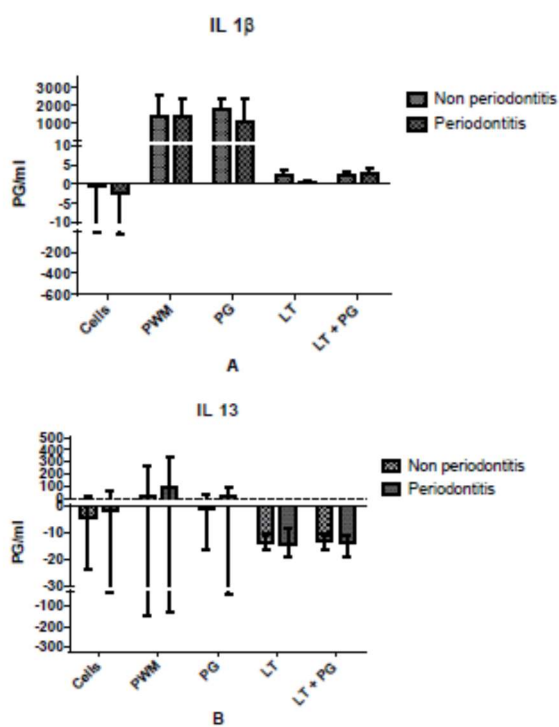
Cytokines quantification

The NP group showed higher concentrations of IL-1 β (figure 1A) than the P group when the cells were grown with the *P. gingivalis* extract ($P=0.007$) and when the cells were grown with the *L. thymoides* extract ($P=0.004$). The cells of

the P group cultured in the presence of both extract concomitantly produced higher levels of IL-1 β (figure 1A) than the cells of the NP group cultured at the same condition, however, this difference was not statistically significant (P=0.92).

It was not observed statistically significant differences between P and NP in the production of IL 13 (figure 1B) and IL-10 (figure 1C). However, it's important to note that the IL-10 amount was higher in the NP group for all the tested culture conditions.

Due to the small sample size in the P group the comparison of INF- γ and IL 17 levels were lost.



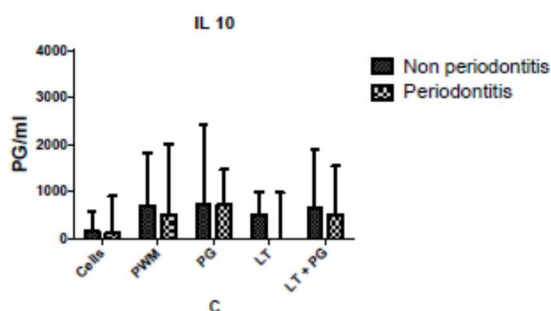


Figure 1: Concentration of cytokines in the supernatants of cells cultured in the presence of PWM, *P. gingivalis* extract, *L. thymoides* extract, *P. gingivalis* extract + *L. thymoides* extract or in the absence of stimulus (nonstimulated cells). A: IL-1 β , B: IL-13 and C: IL-10.

Comparison between the stimuli used in cell culture

27
28
29
30
31
32
33
34
35

The data of P and NP groups were pooled, and the differences in the cytokine levels among the various culture conditions were tested. There was a statistically significant difference in the levels of IL-10 ($P=0.007$), IL-17 ($P=0.001$), IFN- γ ($P=0.000$), IL-1 β ($P=0.000$) and IL-13 ($P=0.000$), as demonstrated in the figure 2.

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

The *P. gingivalis* extract induced higher production of IL-10 ($P=0.004$), IL-17 ($P=0.006$), IFN- γ ($P=0.000$) and IL-1 β ($P=0.000$) in comparison with the production by the unstimulated cells. On the other hand, the *L. thymoides* extract inhibit IL-13 production ($P=0.000$) and induced IFN- γ production ($P=0.019$). In the supernatants of the cells cultured in the concomitant presence of the both extract, it was found a higher production of IL-10 ($P=0.007$) and IL-17 ($P=0.039$), as well as lower production of IL-13 ($P=0.000$) in comparison with the unstimulated cells.

47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The cells cultured with the *P. gingivalis* extract showed higher concentration of IL-10 ($P=0.041$), IL-17 ($P=0.038$), IL-1 β ($P=0.000$) and IL-13 ($P=0.000$) than those induced by the cells cultured with the *L. thymoides* extract. Interestingly, the presence of the *L. thymoides* extract concomitant to the *P. gingivalis* extract led to a reduction of IL-1 β ($P=0.000$) and IL-13 ($P=0.000$) levels in relation to the *P. gingivalis* extract alone, although the levels of IL-1 β ($p=0.007$) have still been higher in relation to the extract alone.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

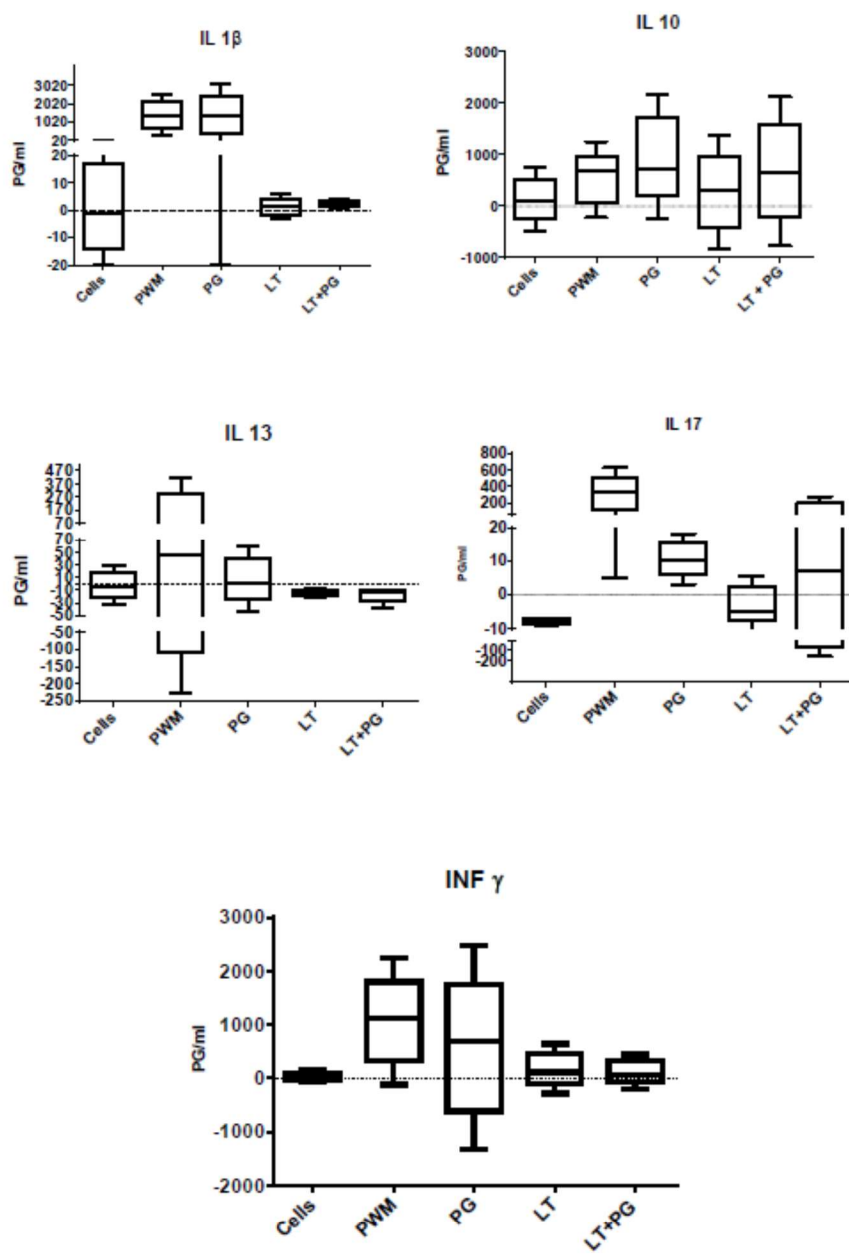


Figure 2: Comparative graphs between cytokines

Discussion

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The main findings of the present study indicate that *L. thymoides* extract may inhibit the in vitro production of IL-1 β and IL-13, counteracting the action of *Porphyromonas gingivalis* extract on human mononuclear cells. *P. gingivalis* is a gram-negative anaerobic microorganism, considered a key pathogen in periodontal dysbiosis (BLASCO-BAQUE, et al, 2017; OLSEN, et al., 2017). It has numerous molecules with antigenicity characteristics, which interact with the host tissue, inducing the production of cytokines such as IL 10, IL 1 β , IL 6, INF- γ , TNF- α , IL 8, IL 13, IL 17 and IL 23 (KARIU et al., 2019; CARDOSO, et al., 2018; FERREIRA, et al., 2017; FIGUEREDO, et al., 2017; MAEKAWA et al., 2014 TRINDADE et al., 2012). These mediators participate in the pathogenesis of periodontitis allowing the migration of precursors of osteoclasts to the bone surface. There occurs the fusion of the precursors, giving rise to osteoclasts. The RANKL-RANK-osteoprotegerin (OPG) axis is considered crucial in this process (SOKOS, et al., 2014). Periodontal ligament fibroblasts mainly produce OPG, an inhibitory molecule of osteoclastogenesis. However, they can be influenced in vivo by indirect interactions with bacteria or by mechanical loading. Incubation of periodontal ligament fibroblasts with bacterial or bacterial components causes increased expression of RANKL and other osteoclast-stimulating molecules, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) (THIELE, et al. al., 2018; SOKOS, et al., 2014). These mediators included in the host response may, therefore, positively regulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in lesions affected by periodontitis (SORSA, et al., 2015). MMPs represent a structure of related but genetically distinct proteases that act not only on physiological and tissue remodeling but also on pathological development. MMPs can collectively degrade almost all components of the extracellular matrix and membrane base, and their pathologically excessive activity leads to the destruction of periodontal tissue (SALAZAR, 2013; SORSA, et al., 2006).

The proinflammatory cytokine IL-1 β , is expressed by many cells, including macrophages, NK cells, monocytes, dendritic cells and neutrophils (GIRALDO et al., 2009). Periodontal pathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*, are capable of producing molecules that can stimulate its production (SANTOS-LIMA et al., 2019; TRINDADE et al., 2012). This cytokine is involved in imbalance of the RANK-RANKL-OPG axis, being responsible for causing alveolar bone resorption (PETEAN, et al., 2019;). Therefore, substances that can inhibit the production of IL-1 β can reduce alveolar bone resorption by inhibiting this cytokine (AOKI-NONAKA, et al., 2019; KOOK et al., 2017).

However, IL-13, a Th2 immune response profile cytokine, suppresses the production of proinflammatory cytokines by monocytes / macrophages (CHEN, et al., 2016). Thus, the inhibition of these two mediators may indicate a potential

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

immunomodulatory role of *L. thymoides* extract which may protect tissues from the onset and progression of periodontitis.

On the other hand, there are studies that affirm that the polarization of the host response to a Th2-type profile may be protective against the progression of periodontitis (CARVALHO-FILHO, et al., 2016). *L. thymoides* extract inhibited the production of IL-13 in comparison to cells cultured without stimulation. As IL-13 induces both the regulation of TGF- β , and suppresses the production of matrix metalloproteinase 1, preventing the collagen destruction (BROWN-LOBBINS, et al., 2018), this result may contraindicate the use of the plant extract in the periodontitis. However, in the experiments performed in this study, the concentrations of IL 13 detected in both the P and NP groups were very low, which could imply in vivo a lower performance of this cytokine in the pathogenesis of the disease. Functionality tests would be necessary for a better understanding of the role of cytokines in the context of the periodontal microenvironment, with the presence of other bacteria and of several mediators being produced concomitantly.

Notably, *L. thymoides* extract showed the ability to negatively modulate IFN- γ production induced by *P. gingivalis*, since its production by cells cultured with plant extracts and bacteria was lower than that observed in the supernatant of cultured cells in the presence of only the bacteria. Although this difference was not statistically significant, it is possible to graphically observe its relevance, suggesting the need to discuss this finding. It is possible that the small sample size has impacted on the power of the statistical test. IFN- γ is a Th1 response profile signature cytokine, classically responsible for protection against intracellular pathogens (ABBAS, et al., 2015). Despite being an extracellular pathogen, *P. gingivalis* can optionally infect host cells, such as macrophages and fibroblasts, and induce the production of IFN- γ (GMITEREK, et al., 2016). This cytokine has potent pro-inflammatory action in innate and adaptive immunity not only inducing the production of cytokines and chemokines (ISAZA-GUZMÁN, et al., 2015) but also by the positive regulation of the expression of several membrane proteins including class I and II of the major histocompatibility complex (MHC) antigens, Fc receptors, leukocyte adhesion molecules and B7 family antigens. In addition, IFN- γ is a potent activator of macrophage effector functions. It directs synthesis, class exchange, and immunoglobulin secretion by B cells (PESTKA S. et al., 2004).

In relation to IL-10 and IL-17, the results show that the extract of *P. gingivalis* is able to increase their concentration, but the extract of *L. thymoides* is not able to modulate their production, since its levels remained high when the cells were cultured with both extracts. The maintenance of high concentrations of IL-10 may be a positive aspect, since this cytokine plays an important role in the regulation of the immune response, being a potent anti-inflammatory cytokine, besides contributing to the maintenance of bone mass through inhibition of

1
2
3 osteoclastic bone resorption and the regulation of osteoblastic bone formation
4 (TRINDADE et al., 2012; ZHANG et al., 2014). The polymorphism in the IL-10 (-
5 597) gene in individuals with periodontitis may lead to lower production of this
6 cytokine, and these individuals are subject to greater tissue destruction
7 (TOKER, et al., 2018).
8
9

10
11 IL-17 is the Th17 profile signature cytokine, characterized by the great
12 involvement of neutrophils in the response to infections. This feature is very
13 prominent in periodontitis, whose neutrophilic involvement is widely reported
14 (Thornton-Mros, et al., 2019; Batool, et al., 2018). *P. gingivalis* has been shown
15 to induce an increase in IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells,
16 which leads to increased expression of CD4 + T cells (CHENG et al., 2016).
17
18

19 This exacerbation of the immune response, both innate and adaptive, may be
20 responsible not only for the defense against periodontal infection, but also for
21 the destruction of the periodontal tissues (SOMMER, et al., 2019).
22
23

24 Interestingly, in the comparison of cytokine production between diseased and
25 non-diseased individuals, the group of subjects without periodontitis had higher
26 levels of IL-1 β than the group with periodontitis when the cells were stimulated
27 with *P. gingivalis* extract and extract of *L. thymoides* leaves alone. It is possible
28 that the local role of this cytokine is more relevant than its distance action, since
29 its presence is marked in gingival fluid and diseased tissues (ROMANO, et al.,
30 2018). One of the limitations of this study is the use of peripheral blood cells
31 rather than local cells. This is minimized by the use of antigens in culture,
32 simulating the paracrine action of cytokines, more relevant than its endocrine
33 action.
34
35
36
37

38 Another limitation of the study is the small size of the sample, peculiar to in vitro
39 tests due to the execution costs, besides the strict eligibility criteria, which made
40 it difficult to compose the groups, especially those with periodontitis. In addition,
41 periodontitis is a disease that can have different levels of severity in the same
42 individual and even in a single tooth (PAPAPANOU, et al., 2018; HINRICHS &
43 NOVAK, 2011). Thus, a robust diagnosis for the classification of patients in this
44 type of study is an essential condition.
45
46
47

48 So, by the analysis of periodontal clinical descriptors, the groups were well
49 characterized for the diagnosis of periodontitis since the criterion used for the
50 classification (Gomes-Filho et al., 2007) is more specific than sensitive, in other
51 words, there are few probability of being found false positives. This
52 classification ensured a greater reliability of the results, but reduced the
53 possibility of recruiting sick individuals.
54
55
56

57 In relation to the methanolic extract of *L. thymoides*, the concentration adopted
58 for the experiments (10%) showed low cytotoxicity in test with brine shrimp (3%
59 mortality in the concentration of 10 μ g / ml with ethanol in 72 hours and 10% in
60

1
2
3 the same concentration and time with DMSO), the same occurring in the cell
4 viability test. The extract without dilution had a protein concentration of 3.314
5 mg / ml, which may be due to the presence of some products of the secondary
6 metabolism of the plant, such as alkaloids, rich in tryptophan and tyrosine
7 (PINTO, et al., 2013; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013). It is worth noting that
8 several factors may influence the chemical composition of the plant and the
9 total amount of protein, such as soil composition, harvesting time and climatic
10 factors such as precipitation and insolation (SILVA, 2012).

11 12 13 14 15 Conclusion

16
17 From the above, *L. thymoides* is a medicinal plant with immunomodulatory
18 potential, being able to be a source of new products in the treatment of chronic
19 periodontitis.
20

21 22 23 REFERENCES

- 24
25 Abbas, A. K.; et al. *Imunologia Celular e Molecular*, Elsevier, 8. Ed. 2015.
- 26
27 Aoki-Nonaka, Y., Tabeta, K., Yokoji, M., Matsugishi, A., Matsuda, Y.,
28 Takahashi, N., ... Yamazaki, K. (2019). The Amyl-1-18 peptide derived from
29 rice inhibits alveolar bone resorption via suppression of inflammatory cytokine
30 production induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β in mice. **Journal of**
31 **Periodontology**. doi:10.1002/jper.18-0630.
- 32
33 Batool, H., Nadeem, A., Kashif, M., Shahzad, F., Tahir, R., & Afzal, N. (2018).
34 Salivary Levels of IL-6 and IL-17 Could Be an Indicator of Disease Severity in
35 Patients with Calculus Associated Chronic Periodontitis. **BioMed Research**
36 **International**, 2018, 1–5. doi:10.1155/2018/8531961
- 37
38 Blasco-Baque, V., Garidou, L., Pomié, C., et al. (2016). Periodontitis induced by
39 *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin
40 resistance via an impaired adaptive immune response . **Gut**, 66(5), 872–885.
41 doi:10.1136/gutjnl-2015-309897
- 42
43 Brown Lobbins, M. L., Shivakumar, B. R., Postlethwaite, A. E., & Hasty, K. A.
44 (2017). Chronic exposure of interleukin-13 suppress the induction of matrix
45 metalloproteinase-1 by tumour necrosis factor α in normal and scleroderma
46 dermal fibroblasts through protein kinase B/Akt. *Clinical & Experimental*
47 *Immunology*, 191(1), 84–95. doi:10.1111/cei.13045
- 48
49 Cardoso, E. M., Reis, C., & Manzanares-Céspedes, M. C. (2017). Chronic
50 periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic
51 diseases. **Postgraduate Medicine**, 130(1), 98–104.
52 doi:10.1080/00325481.2018.1396876
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Carvalho-Filho, P. C., Gomes-Filho, I. S., Meyer, R., Olczak, T., Xavier, M. T., & Trindade, S. C. (2016). Role of Porphyromonas gingivalis HmuY in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. **Mediators of Inflammation**, 2016, 1–9. doi:10.1155/2016/7465852

Chen, D., Zhang, T., & Wang, X. (2016). Association between Polymorphisms in Interleukins 4 and 13 Genes and Chronic Periodontitis in a Han Chinese Population. **BioMed Research International**, 2016, 1–7. doi:10.1155/2016/8389020

Cheng, W.-C., van Asten, S. D., Burns, L. A.; et al. (2016). Periodontitis-associated pathogens P. gingivalis and A. actinomycetemcomitans activate human CD14+ monocytes leading to enhanced Th17/IL-17 responses. **European Journal of Immunology**, 46(9), 2211–2221. doi:10.1002/eji.201545871

Dias, C. R. S. ; et al. A Doença Periodontal Como Fator de Risco Para os Acidentes Cerebrovasculares. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, 7(3):325-329, set./dez. 2007. doi: 10.4034/1519.0501.2007.0073.0021

Eke, P. I., Thomson-Evans, G., Dye, B., & Genco, R. (2012). Advances in Surveillance of Periodontitis: The Centers for Disease Control and Prevention Periodontal Disease Surveillance Project. **Journal of Periodontology**, 83(11), 1337–1342. doi:10.1902/jop.2012.110676

Ferreira, L. C.; et al. Análise da resposta inflamatória na progressão da periodontite experimental ao longo do tratamento com zoledronato. **Arch Health Invest** 2017;6, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v6i0.2255>

Figueredo, C. M. S.; et al. Expressão de citocinas relacionadas à resposta th17 nos tecidos gengival e intestinal de pacientes com periodontite e doença inflamatória intestinal. **Braz J Periodontol**. vol 27 - issue 01, 2017. ISSN-0103-9393

Gmiterek, A., Kłopot, A., Wójtowicz, H., Trindade, S. C., Olczak, M., & Olczak, T. (2016). Immune response of macrophages induced by Porphyromonas gingivalis requires HmuY protein. **Immunobiology**, 221(12), 1382–1394. doi:10.1016/j.imbio.2016.07.007

Giraldo, S ; et al. IL1B (interleukin 1, beta). **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**. ;13(4):273-275, 2009. ISSN 1768-3262. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/IL1BID40950ch2q13>. Access on July 7, 2019.

Gomes-Filho, I. S., Soledade-Marques, K. R., Seixas da Cruz, S.; et al. (2014). Does Periodontal Infection Have an Effect on Severe Asthma in Adults? **Journal of Periodontology**, 85(6), e179–e187. doi:10.1902/jop.2013.130509

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Gomes-Filho, I. S., Cruz, S. S., Rezende, E. J. C.; et al. (2007). Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. **Journal of Clinical Periodontology**, 34(11), 957–963. doi:10.1111/j.1600-051x.2007.01141.x

Hinrichs, J. H.; novak, M. J. **Classificação das Doenças e Condições que Afetam o Periodonto**. In: Carranza, Periodontia Clínica / [editores] Michael G. Newman, Henry H. Takei e Perry R. Klokkevold ; editor emérito Fermin A. Carranza ; [tradução Débora Rodrigues Fonseca... et al.]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.1328p. ISBN=8535259988

Isaza-Guzmán, D. M., Cardona-Vélez, N., Gaviria-Correa; et al. (2015). Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**, 60(1), 91–99. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.09.002

Kariu, T., Ikeda, T., Nakashima, K., Potempa, J., & Imamura, T. (2019). A natural anti-periodontitis agent, epimedokoreanin B, inhibits virulence activities of gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 1–3. doi:10.1080/09168451.2019.1597615

Kook, K. E.; et al. Inhibitory Effect of Standardized Curcuma xanthorrhiza Supercritical Extract on LPS-Induced Periodontitis in Rats. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 27, n. 11, 2017. doi: 10.4014/jmb.1808.08052.

Lindhe, J. ; et al. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral** [tradução Edson Jorge Lima Moreira] 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Maekawa, T., Krauss, J. L., Abe; et al. (2014). *Porphyromonas gingivalis* Manipulates Complement and TLR Signaling to Uncouple Bacterial Clearance from Inflammation and Promote Dysbiosis. **Cell Host & Microbe**, 15(6), 768–778. doi:10.1016/j.chom.2014.05.012

Magalhães, A. O. **Isolamento e identificação de substâncias com ação espasmolítica de folhas de *Lippia thymoides* Mart & Schauer (Verbenaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, 69(1), 7–17. doi:10.1111/prd.12104

Nile, S. H., Keum, Y. S., Nile, A. S., Jalde, S. S., & Patel, R. V. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant

1
2
3 flavonoids and their synthesized derivatives. **Journal of Biochemical and**
4 **Molecular Toxicology**, 32(1), e22002. doi:10.1002/jbt.22002

5
6
7 Olsen, I., Lambris, J. D., & Hajishengallis, G. (2017). Porphyromonas gingivalis
8 disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function.
9 **Journal of Oral Microbiology**, 9(1), 1340085.
10 doi:10.1080/20002297.2017.1340085

11
12
13 Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, et al. (2018). Periodontitis: Consensus
14 report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of
15 Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of**
16 **Periodontology**, 89, S173–S182. doi:10.1002/jper.17-0721

17
18
19
20
21 Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like
22 cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, 202(1), 8–32.
23 doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x

24
25
26 Petean, I. B. F.; et al. Genetic Polymorphisms in RANK and RANKL are
27 Associated with Persistent Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**
28 Volume 45, Issue 5, Pages 526-531, 2019. Doi: 10.1016/j.joen.2018.10.022

29
30
31 Peters, B. A., Wu, J., Pei, Z.; et al. (2017). Oral Microbiome Composition
32 Reflects Prospective Risk for Esophageal Cancers. **Cancer Research**, 77(23),
33 6777–6787. doi:10.1158/0008-5472.can-17-1296

34
35
36 Pinto, C. da P., Rodrigues, V. D., Pinto, F. da P.; et al. (2013). Antimicrobial
37 Activity of Lippia Species from the Brazilian Semi-arid Region Traditionally Used
38 as Antiseptic and Anti-Infective Agents. **Evidence-Based Complementary and**
39 **Alternative Medicine**, 2013, 1–5. doi:10.1155/2013/614501

40
41
42 Ribeiro, V. P., Arruda, C., Abd El-Salam, M., & Bastos, J. K. (2018). Brazilian
43 medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review.
44 **Pharmaceutical Biology**, 56(1), 253–268.
45 doi:10.1080/13880209.2018.1454480

46
47
48 Romano, F., Bongiovanni, L., Bianco, et al. (2017). Biomarker levels in gingival
49 crevicular fluid of generalized aggressive periodontitis patients after non-
50 surgical periodontal treatment. **Clinical Oral Investigations**, 22(2), 1083–1092.
51 doi:10.1007/s00784-017-2192-1

52
53
54 Salazar, M. G., Jehmlich, N., Murr, A.; et al. (2013). Identification of periodontitis
55 associated changes in the proteome of whole human saliva by mass
56 spectrometric analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, 40(9), 825–832.
57 doi:10.1111/jcpe.12130

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Santos-Lima, E. K. N., Oliveira, Y. A., Santos, R. P. B.; et al. (2019). Production of Interferon Gamma, Interleukin 6 and Interleukin 1 β by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with Novel Lys-Gingipain Synthetic Peptides. *Journal of Periodontology*. doi:10.1002/jper.18-0626

Silva, F.S. **Estudo Fitoquímico e Farmacológico de Lippia thymoides MART. & SCHAUER (verbenaceae)**. Tese (Doutorado -Área de concentração: Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2012.

Silva, I; et al. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Editora Educativa; 100p., 1995.

Soares, B. V., Tavares-Dias, M. Espécies de Lippia (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*. 3(1):109-123, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n1p109-123>

Sokos, D., Everts, V., & de Vries, T. J. (2014). Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *Journal of Periodontal Research*, 50(2), 152–159. doi:10.1111/jre.12197

Sommer, M. E. L., Dalia, R. A., Nogueira, A. V. B., Cirelli, J. A., Vinolo, M. A. R., Fachi, J. L., ... Felonato, M. (2018). Immune response mediated by Th1 / IL-17 / caspase-9 promotes evolution of periodontal disease. *Archives of Oral Biology*. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.09.009

Sorsa, T., Gursoy, U. K., Nwhator, S.; et al. (2015). Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 70(1), 142–163. doi:10.1111/prd.12101

Sorsa, T., Tjäderhane, L., Kontinen, Y. T.; et al. (2006). Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine*, 38(5), 306–321. doi:10.1080/07853890600800103

Taylor, S.; Hennekens, C. H. Interrelationships of Periodontal Disease, Systemic Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Ann Dentist Oral Disord*. 2:108, 2018.

Thiele, S.; et al. Recent advances in periodontitis, a prototypic osteo-immunological disease. *J Lab Precis Med* 3:101, 2018. Doi: 10.21037/jlpm.2018.12.01

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Thorbert-Mros, S., Larsson, L., Kalm, J., & Berglundh, T. (2018). Interleukin-17 producing T cells and interleukin-17 mRNA expression in periodontitis and longstanding gingivitis lesions. **Journal of Periodontology**. doi:10.1002/jper.18-0326

Toker, H., Gorgun, E. P., Korkmaz, E. M., Yüce, H. B., & Poyraz, O. (2018). The effects of IL-10 gene polymorphism on serum, and gingival crevicular fluid levels of IL-6 and IL-10 in chronic periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**, 26(0). doi:10.1590/1678-7757-2017-0232

Trindade, S. C. et al. "Humoral Immunity in the Context of the Relationship between Periodontitis and Severe Asthma - Literature Review". *EC Dental Science* 18.1 (2019): 82-90.

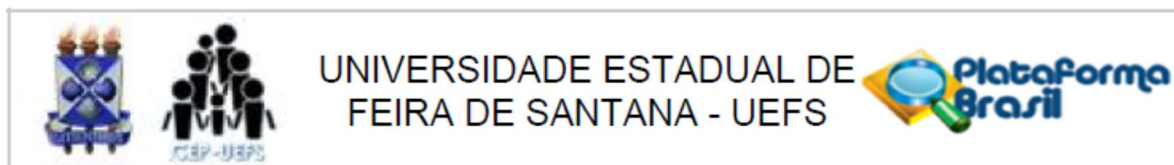
Trindade, S. C., Olczak, T., Gomes-Filho, I. S.; et al. (2013). Porphyromonas gingivalis HmuY-Induced Production of Interleukin-6 and IL-6 Polymorphism in Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, 84(5), 650–655. doi:10.1902/jop.2012.120230

Trindade, S. C., Olczak, T., Gomes-Filho, I. S.; et al. (2011). Induction of interleukin (IL)-1 β , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by Porphyromonas gingivalis HmuY in humans. **Journal of Periodontal Research**, 47(1), 27–32. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01401.x

Trindade, S. C.; et al. Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 10, p. 50-58, 2008. PMID:18564729

Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., et al. (2014). Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. **BioMed Research International**, 2014, 1–5. doi:10.1155/2014/284836

9 ANEXO - PARECER CONSUBSTANCIADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito imunomodulador de extratos e óleos essenciais de plantas nativas da região do semi-árido baiano na periodontite crônica

Pesquisador: Soraya Castro Trindade

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46267915.8.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.344.223

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito imunomodulador de extratos e óleos essenciais de plantas nativas da região do semi-árido baiano na periodontite crônica", do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), tendo por pesquisadores SORAYA CASTRO TRINDADE (Coordenadora e Pesquisadora Responsável); Laerte Oliveira Barreto Neto, Antônio Varela Cancio e Jurandi Nery Pereira Filho (Pesquisadores Colaboradores).

Consta no Resumo do Projeto que "A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, cujo fator etiológico primário constitui-se na presença de biofilme na superfície dentária, tendo a resposta do hospedeiro um papel preponderante no seu início e desenvolvimento. Seu tratamento é baseado na remoção mecânica do biofilme. O uso de adjuvantes químicos para o controle da periodontite também tem sido preconizado em diversas formas de administração, porém a utilização de fitoterápicos para este propósito é bastante restrita. Por outro lado, diversas plantas do semi-árido baiano têm sido utilizadas na medicina popular, com variados efeitos biológicos. Diante deste panorama, o presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito imunomodulador do extrato e dos óleos essenciais das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia organoides*, *Lippia*

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460

UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Parecer: 1.344.223

thymoides, Lippia lasiocalycina, Lippia insignis, Hyptis fruticosa, Hyptis leucocephala e Hyptis macrostachys e das raízes das cactáceas Cereus jamaçaru, Tacinga palmadora, Harrisia adscendens e Opuntia ficus sobre células mononucleares do sangue periférico de voluntários com e sem periodontite. A Toxicidade dos compostos para estas células será testada pelo ensaio colorimétrico de MTT. Em seguida, as células serão cultivadas por 48h em presença dos compostos e os níveis das citocinas IL-6, IL-17, IL-13, TNF-a, IFN-g, IL-8, IL-10 e IL-1b serão dosados por meio de ensaio imunoenzimático. Serão realizados também ensaios para a avaliação da proliferação celular, bem como ensaios para detecção de apoptose e necrose, ambos por citometria de fluxo. Após a análise da distribuição dos dados com o teste de Kolmogorov-Smirnov, os níveis das citocinas entre os indivíduos saudáveis e doentes serão comparados utilizando-se os testes T de Student ou Mann-Whitney." (Projeto Detalhado e Informações Básicas do Projeto/Plataforma Brasil)

HIPÓTESE: "Será que a utilização de compostos de plantas encontradas na região do semi-árido baiano pode ser uma alternativa mais viável ao tratamento adjuvante da doença periodontal, sem os riscos de resistência bacteriana ou de poluição do meio ambiente?"

METODOLOGIA: Trata-se de um Estudo caso-controle. Os pesquisadores apresentam de forma detalhada as etapas da pesquisa: Coleta do Material Vegetal; Obtenção dos óleos essenciais e análise da composição química; Obtenção, processamento dos extratos brutos e análise química; Seleção da Amostra; Coleta de Sangue e Separação de CMSP; Cultivo Celular; Avaliação da citotoxicidade; Citometria de Fluxo para Avaliação de Proliferação Celular e Apoptose/Necrose; Ensaio Imunoenzimático ELISA para Detecção de Citocinas; e Análise Estatística. Em relação à Seleção da Amostra, "Serão convidados a compor amostra os indivíduos com boa saúde sistêmica que buscarem atendimento odontológico nos ambulatórios do curso de Odontologia da UEFS. Os critérios de não inclusão avaliados pela anamnese e considerados para este estudo serão: história de doenças sistêmicas, gestação atual, tratamento periodontal anterior, fumo atual ou anterior, uso de antibióticos e antiinflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta. Comporão o grupo caso 30 indivíduos diagnosticados com periodontite crônica, enquanto o grupo controle será

composto por 30 indivíduos sem periodontite. Os participantes receberão todas as devidas informações sobre a pesquisa e, posteriormente, serão preenchidos formulários para obtenção e assinatura do termo de consentimento informado, permanecendo uma cópia com os mesmos. A

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460

UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.344.223

avaliação da condição periodontal será realizada por um único examinador devidamente calibrado utilizando como referência os descritores clínicos periodontais propostos por GOMES-FILHO et al. (2007). O registro será feito na ficha de exame bucal formulada para este projeto." No que diz respeito à Coleta de Sangue e Separação de CMSP, "Um volume de 30mL de sangue dos participantes será coletado por punção venosa na fossa ante-cubital com tubo tipo Vacutainer estéril (BDSP)[...]".

Apresenta Cronograma atualizado e Orçamento com a descrição da contrapartida da UEFS.

A pesquisadora coordenadora/responsável do Projeto tem experiência na área da pesquisa a ser desenvolvida, de acordo com o currículo lattes.

Objetivo da Pesquisa:

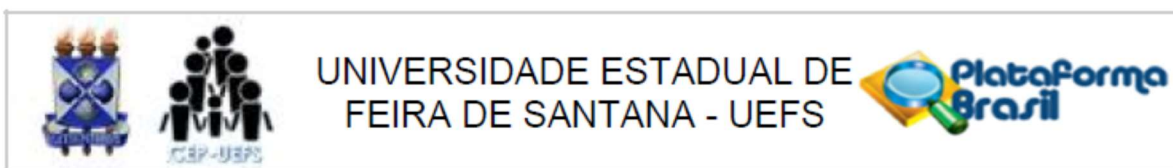
"Objetivo Primário:

- Avaliar o efeito imunomodulador das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia origanoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, *Lippia alba*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala* e *Hyptis macrostachys* e das raízes das cactáceas *Cereus jamacaru*, *Tacinga palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* sobre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) humanas.

Objetivos Secundários:

- Investigar o papel dos óleos essenciais e dos extratos brutos das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia origanoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, *Lippia alba*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala*, *Hyptis macrostachys*, *Cereus jamacaru*, *Tacinga palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* na proliferação e/ou na morte de CMSP de pacientes com e sem periodontite crônica;
- Estudar a capacidade destes óleos e extratos na inibição ou indução da produção de citocinas IL-6, IL-17, IL-13, TNF α , IFN-g, IL-8, IL-10 e IL-1b em CMSP de pacientes com e sem periodontite crônica;
- Determinar as concentrações imunomoduladoras dessas substâncias;
- Identificar aqueles extrato com maior potencial imunomodulador para ser(em) usada(s) em um dentifício ou colutório." (formulário simplificado Plataforma Brasil)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.344.223

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

"Os riscos serão mínimos, pois todas as normas de biossegurança serão seguidas durante o atendimento e coleta de sangue dos indivíduos portadores ou não de periodontite. Além disso, a confidencialidade e anonimato dos participantes será realizada." (Informações Básicas do Projeto/Plataforma Brasil)

"Durante a coleta de sangue do seu braço, você poderá sentir dor. A intensidade da dor varia entre cada indivíduo, porém é uma dor suportável. Quanto mais tranquilo (a) você estiver, menos doloroso será o procedimento. Após a coleta, pode-se formar um hematoma (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o (a) dentista que realizará a coleta dispõe de meios para contornar esses efeitos indesejáveis." (TCLE).

BENEFÍCIOS:

"Espera-se que o extrato bruto e os óleos essenciais das espécies vegetais *Ocimum basilicum*, *Lippia origanoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia lasiocalycina*, *Lippia insignis*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis leucocephala*, *Hyptis macrostachys*, *Cereus jamacaru*, *Tacinga palmadora*, *Harrisia adscendens* e *Opuntia ficus* apresentem efeito imunomodulador em células humanas, principalmente aquelas provenientes de indivíduos portadores de periodontite. Havendo esta capacidade imunomoduladora, é possível que algumas destas espécies possam ser utilizadas como adjuvantes no tratamento da periodontite. Assim, presente projeto pretende apontar as espécies e formas de apresentação (óleo e extrato) com maior potencial para ser utilizada em veículos como dentifrícios e/ou colutórios para a prevenção e tratamento da periodontite. Com a aquisição dos equipamentos, espera-se a adequação do Laboratório de Imunologia do Curso de Odontologia da UEFS, fortalecendo o referido laboratório e o grupo de pesquisa. O fortalecimento da linha de pesquisa, com a obtenção de recursos e dos dados esperados, fortalecerá também o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS, que poderá contar com a duas teses de doutorado e três dissertações de mestrado, além dos esforços na obtenção de produtos, revertendo o conhecimento científico produzido em tecnologia que favoreça a comunidade." (Informações Básicas do Projeto/Plataforma Brasil)

"Os resultados desta pesquisa nos ajudarão a ter uma melhor compreensão da Periodontite e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a esse tema, inclusive influenciando na

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Parecer: 1.344.223

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	TcleSorayareformulado.doc	30/11/2015 17:54:31	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Outros	Autorizacaolapron.jpg	30/11/2015 17:45:37	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Outros	ProjetoimunoplantasCEP2Soraya.doc	30/11/2015 17:42:56	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Outros	oficioCEPrespostapendencias.doc	30/11/2015 17:40:11	Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_520501.pdf	21/10/2015 21:48:45		Aceito
Outros	Jurandi.pdf	17/06/2015 21:56:22		Aceito
Outros	Termo de Compromisso- LEI 466 Laerte.pdf	17/06/2015 21:55:14		Aceito
Outros	soraya.pdf	17/06/2015 21:54:55		Aceito
Outros	Antonio.pdf	17/06/2015 21:53:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto imuno plantas-SCT2.docx	17/06/2015 21:53:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	01/06/2015 21:39:07		Aceito
Folha de Rosto	Doc Profª Soraya.pdf	01/06/2015 21:37:48		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FEIRA DE SANTANA, 30 de Novembro de 2015

Assinado por:

Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza
(Coordenador)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17

CEP: 44.031-460

UF: BA

Município: FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br