

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITO DO ÁLCOOL PERÍLICO SOBRE
PERIODONTOPATÓGENOS E NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS**

Rebeca Dantas Alves Figueiredo

SAPIENTIA AEDIFICAT

2017

REBECA DANTAS ALVES FIGUEIREDO

**EFEITO DO ÁLCOOL PERÍLICO SOBRE
PERIODONTOPATÓGENOS E NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sabrina Garcia de Aquino

João Pessoa

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F475e Figueiredo, Rebeca Dantas Alves.

Efeito do álcool perílico sobre periodontopatógenos e na modulação da resposta inflamatória de macrófagos / Rebeca Dantas Alves Figueiredo. - João Pessoa, 2017. 50 f. : il.

Orientação: Sabrina Garcia de Aquino.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

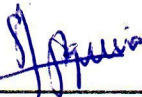
1. Doença Periodontal. 2. Imunomodulação. 3. Macrófagos. 4. Produtos Naturais. I. Aquino, Sabrina Garcia de. II. Título.

UFPB/BC

REBECA DANTAS ALVES FIGUEIREDO

EFEITO DO ÁLCOOL PERÍLICO SOBRE
PERIODONTOPATÓGENOS E NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

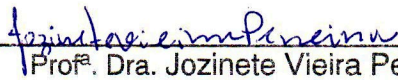
Banca Examinadora



Prof^a. Dra. Sabrina Garcia de Aquino
Orientadora



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano
Examinador - UFPB



Prof^a. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

*A Deus, minha fortaleza,
e à minha amada família,
Mamãe, Papai, Raquel e Títia,
a razão do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que através de seu infinito amor permitiu que eu chegasse até aqui e superasse as provações durante esta caminhada. És tudo em mim! À **Nossa Senhora**, pela sua incessante intercessão e pelo amparo nos momentos difíceis.

Aos meus amados pais, **José de Alencar e Suelenia**, por tamanha dedicação, amor, apoio e incentivo, por se fazerem sempre presentes, apesar da distância, e por acreditarem em mim mais do que eu mesma. Eis a razão que me motiva a continuar e ser melhor como pessoa e profissional.

À minha querida irmã, **Raquel**, pela cumplicidade, amizade e união. Te amo!

À minha tia, **Anne Daniella**, pelo companheirismo, amizade e por dividir comigo os prazeres do cotidiano, transformando a rotina em alegria.

Ao meu namorado, **Douglas**, pelo amor, carinho e paciência, por tantas vezes ter sido o meu porto seguro diante das tribulações e por sempre me arrancar sorrisos. Sou muito feliz de poder compartilhar os melhores momentos da minha vida com você!

À minha tia, madrinha e fonte de inspiração, **Roseni**, pelas diversas vezes que assumistes o papel de mãe e por sua carinhosa contribuição para a minha formação acadêmica e pessoal.

Às grandes amigas que conquistei no mestrado, **Klidenberg e Priscilla**, pela infinita cumplicidade, lições diárias, risadas, por compartilhar bons e maus momentos. Amo vocês!

Aos amigos **Taisa, Lanne, Bruno, Pedro e Cordeiro**, pela amizade, companheirismo e por tornar esses dois anos mais leves.

À minha eterna dupla e grande amiga, **Isabelle Cristine**, por me transmitir confiança e paz, fazendo com que eu me sinta mais próxima de Deus. A sua fé me inspira!

Às amigas que adquiri na graduação e que levarei para a vida, **Cíntia e Vanessa**, pela força e cumplicidade.

À **Maria Luisa**, por sua amizade e por me acolher com tanto carinho em Araraquara. Não tenho palavras para agradecer!

À **Ana Cláudia**, minha companheira de laboratório da UFPB, com quem eu dividi os horários, atividades, alegrias e angústias e com quem tanto aprendi.

À **Laura, Adriana, Natalie e Cindy**, minhas companheiras de laboratório em Araraquara, pelo auxílio na realização dos experimentos, até mesmo nos finais de semana.

À minha orientadora, **Sabrina Garcia de Aquino**, por quem tenho grande admiração! Agradeço pela confiança, pelas oportunidades, atenção, contribuições e por estar sempre presente.

Ao meu co-orientador, professor **Carlos Rossa Júnior**, por todos os ensinamentos e pela grande contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao professor **Mário Júlio**, pelo suporte técnico para que fossem realizados os experimentos microbiológicos.

Ao professor **Ricardo Dias de Castro**, pela infinita disponibilidade e por ser sempre tão solícito.

Aos familiares e amigos, pelo incentivo e pelas orações para o meu sucesso nessa etapa acadêmica.

Aos colegas de turma, pelos prazeres e dificuldades compartilhadas.

RESUMO

Objetivo: Este estudo demonstra a atividade antibacteriana e o efeito do álcool perílico (POH) na modulação da resposta inflamatória de macrófagos *in vitro*.

Métodos principais: A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do POH sobre patógenos periodontais foram determinadas por macrodiluição e subcultivo, respectivamente. A citotoxicidade do POH sobre macrófagos RAW 264.7 foi avaliada por Azul de Trypan e MTS. O efeito na proliferação celular foi avaliado por Azul de Trypan nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi analisada por citometria de fluxo e a análise do perfil M1/M2 pela expressão gênica de TNF e arginase1 por PCR em tempo real. **Principais conclusões:** O POH foi eficaz contra *P. gingivalis* (ATCC 33277) e *F. nucleatum* (ATCC 25586) com CIM= 250µg/mL. Até 100µM, não foi observada citotoxicidade sobre macrófagos. A proliferação celular foi inibida a partir das 48 horas a 100µM ($p < 0.05$) e 250µM ($p < 0.01$). POH aumentou a produção de ROS a 10µM e 100µM ($p < 0.05$) em células não estimuladas. A produção de ROS induzida por PMA não foi afetada pelo POH, enquanto 100 µM reduziram significativamente as ROS induzidas por LPS. A expressão do TNF não foi afetada pelo POH em células não estimuladas ou em células polarizadas para o fenótipo M1, enquanto ambas as concentrações de POH reduziram ($p < 0,05$) a expressão de arginase-1 em macrófagos polarizados por M2. **Significância:** O POH mostrou ação antimicrobiana sobre patógenos periodontais e redução da proliferação de macrófagos murinos sem citotoxicidade significativa em concentrações de até 100µM. Além disso, POH não afetou a produção de ROS por macrófagos e favoreceu o fenótipo M1, como a expressão de arginase-1 foi inibida em macrófagos polarizados por M2.

Palavras-chave: Doença periodontal; Imunomodulação; Macrófagos; Produtos Naturais.

ABSTRACT

Purpose: The study demonstrates an antibacterial activity and effect of perillyl alcohol (POH) on the modulation of the inflammatory response of macrophages in vitro. **Main methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (MBM) of POH on periodontal pathogens were determined by macrodilution and subculture, respectively. The cytotoxicity of POH on RAW 264.7 macrophages was assessed by Trypan Blue and MTS. The effect on cell proliferation was evaluated by Trypan Blue at periods of 24, 48 and 72 hours. The production of reactive oxygen species (ROS) was analyzed by flow cytometry and the M1/M2 profile by the gene expression of TNF and arginase1 by real-time PCR. **Key findings:** POH was effective against *P. gingivalis* (ATCC 33277) and *F. nucleatum* (ATCC 25586) with MIC = 250 µg / mL. Up to 100uM, no cytotoxicity was observed on macrophages. Cell proliferation was inhibited from 48 hours at 100µM (p <0.05) and 250µM (p <0.01). POH increased ROS production at both 10µM and 100µM (p <0.05) in unstimulated cells. PMA-induced production of ROS was not affected by POH, whereas 100 uM significantly reduced LPS-induced ROS. Expression of TNF was not affected by POH in unstimulated cells or in cells polarized to M1 phenotype, whereas both concentrations of POH reduced (p<0.05) the expression of arginase-1 in M2-polarized macrophages. **Significance:** POH has antibacterial activity against periodontal pathogens and reduced proliferation of murine macrophages without significant cytotoxicity at concentrations up to 100µM. In addition, POH did not affect ROS production by macrophages and favored the M1-phenotype, as expression of arginase-1 was inhibited in M2-polarized macrophages.

Keywords: Periodontal disease; Immunomodulation; Macrophages; Natural Products.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma (s)

µL – Microlitro (s)

µM - Micromolar

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO – Dimetilsufóxido

FBS – Fetal Bovine Serum

IFN-γ – Interferon gama

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

mg – Miligrama (s)

mL – Mililitro (s)

MTS - ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazólico)

ng – Nanograma (s)

NF-κB – Nuclear Factor Kappa B

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCR – Polymerase Chain Reaction

PMA – Phorbol Myristate Acetate

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde

POH - Álcool Perílico

ROS - Reactive Oxygen Species

SUS – Sistema Único de Saúde

TLR – Toll-Like Receptors

TNF – Tumor Necrosis Factor

TPA – 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Produtos do metabolismo do limoneno: álcool perílico, aldeído perilla e ácido perílico, respectivamente.....	3
Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dadas em mg/mL do POH e clorexidina a 0,12% (controle) contra microrganismos anaeróbios estritos.....	13
Figura 1 – Efeito do POH sobre a viabilidade de macrófagos.....	14
Figura 2 – Citotoxicidade do POH (10-250uM) em células RAW 264.7 tratadas pelo período de 24 horas.....	15
Figura 3 - Efeito do POH na proliferação de células RAW 264.7 cultivadas <i>in vitro</i> pelos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	16
Figura 4 – Efeito do POH sobre a produção de ROS na presença de PMA.....	18
Figura 5 – Efeito do POH sobre a produção de ROS na presença de LPS.....	19
Figura 6 - Expressão gênica (RNAm) de TNF avaliada por RT-qPCR em RAW 264.7.....	20
Figura 7 - Expressão gênica (RNAm) de arginase avaliada por RT-qPCR em RAW 264.7.....	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. CAPÍTULO 1	6
Introdução	7
Materiais e Métodos	8
Determinação da atividade antimicrobiana contra patógenos periodontais	8
Linhagem celular e preparação do Álcool Perílico	9
Ensaio de citotoxicidade: Azul de Trypan e MTS	10
Ensaio de proliferação	11
Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	11
Imunofenotipagem	12
Análise estatística	13
Resultados	13
Determinação da atividade antimicrobiana contra patógenos periodontais	13
Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular	14
Ensaio de proliferação	15
Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	17
Imunofenotipagem	20
Discussão	21
Conclusão	25
Referências	26
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	31
4. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS*	34

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, grandes avanços na pesquisa em Periodontia aumentaram o conhecimento sobre a etiopatogenia e os mecanismos imunológicos que norteiam a resposta do hospedeiro frente o desafio microbiano. Assim, apesar do início da periodontite ser dependente da maturação do biofilme periodontopatogênico, em especial de microrganismos Gram-negativos, sua estabilidade ou progressão é altamente dependente do balanço entre os mediadores pró-inflamatórios ou protetores, o que envolve interações complexas. O atual paradigma da doença periodontal reforça a existência de uma interação dinâmica e multifacetada entre as bactérias periodontopatogênicas e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao desafio microbiano, sendo esta interação influenciada por eventos ambientais e comportamentais adversos, fatores sistêmicos, bem como pela susceptibilidade genética ⁽¹¹⁾.

A presença do biofilme dá início a uma sucessão de eventos imunoinflamatórios desencadeados por fatores de virulência de microrganismos específicos. Estes podem causar danos diretos aos tecidos periodontais, com a liberação de toxinas, enzimas e produtos do metabolismo, e sobretudo danos indiretos, através da interação com receptores celulares do hospedeiro, aumentando a capacidade de invasão bacteriana através do colapso da homeostase ⁽²⁹⁾. Neste processo, o reconhecimento dos patógenos invasores via ativação dos receptores tipo Toll (TLRs) tem um papel fundamental, pois desencadeia uma série de eventos vasculares e moleculares que induzem um quadro de inflamação aguda e ativação da resposta imune inata na doença periodontal, sendo o lipopolissacarídeo (LPS) de microrganismos Gram-negativos reconhecidos preferencialmente via TLR4 ^(4,26).

Neste contexto, alguns tipos celulares participam ativamente no controle da homeostase tecidual do microambiente periodontal, incluindo os macrófagos. Isto porque os macrófagos são altamente prevalentes no sítio acometido por doença periodontal, e, na função de apresentadora de antígenos, representam o protótipo celular envolvido na resposta ao desafio microbiano ⁽¹⁸⁾. Diante do desafio microbiano, macrófagos ativados secretam citocinas importantes na imunorregulação da degradação da matriz extracelular e na reabsorção óssea inflamatória na doença periodontal, entre estas interleucina (IL)-1, IL-6, IL-10, IL-

12 e fator de necrose tumoral (TNF) ^(20, 25, 32). No entanto, o perfil de citocinas liberado, bem como a atividade efetora dos macrófagos é diretamente dependente do fenótipo prevalente. Isso porque existem diferentes subpopulações de macrófagos e cada uma tem suas próprias características e funções. Dentre elas, destacam-se os macrófagos classicamente ativados ou M1 e os macrófagos alternativamente ativados ou M2, os quais são denominados de acordo com o estímulo que induz a sua polarização e o perfil das citocinas liberadas. A caracterização das subpopulações de macrófagos pode ser útil na criação de novas estratégias terapêuticas, complementando as existentes para o tratamento de doenças, como a doença periodontal, utilizando macrófagos como alvo terapêutico ⁽⁷⁾.

Além disso, é importante mencionar que os macrófagos representam os progenitores diretos dos osteoclastos, os quais são as principais células responsáveis pela reabsorção óssea, inclusive na doença periodontal ^(5,19). Deve-se ainda ressaltar o papel essencial da resposta imune adaptativa na patogênese da doença periodontal, sobretudo para a ativação da osteoclastogênese e indução da perda óssea alveolar nos sítios periodontais doentes ^(1,19).

Neste contexto, a busca por uma terapia com a finalidade de modular a resposta do hospedeiro seria interessante como aliado à terapia convencional focada no controle mecânico do biofilme. Dessa forma, novas abordagens terapêuticas têm sido investigadas com o objetivo de não apenas debelar a microbiota patogênica, mas também de intervir na resposta imuno-inflamatória destrutiva da doença periodontal ^(24,27).

Assim, tem crescido o interesse na utilização de produtos naturais como terapia complementar de diferentes doenças, incluindo as de caráter infecto-inflamatório, como a doença periodontal. Essa investigação tem sido o foco de pesquisas *in vitro*, *in vivo*, bem como em ensaios clínicos ^(17, 21, 30). Além disso, a fitoterapia foi institucionalizada no Sistema Único de Saúde (SUS) através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PNPIC) e o Ministério da Saúde apresenta atualmente uma lista com 71 nomes de plantas medicinais com potencial de gerar produtos de interesse ao SUS ⁽⁶⁾.

Dentre esses produtos, os óleos essenciais são líquidos voláteis aromáticos extraídos de plantas e que são conhecidos como ingredientes ativos na fitoterapia ⁽³⁰⁾. Os monoterpenos são os principais componentes dos óleos

essenciais, os quais são caracterizados por apresentarem em sua composição duas unidades de isoprenos e dez átomos de carbono. A maioria das investigações sobre a sua ação na saúde humana foram realizadas com o limoneno, álcool perílico (POH), carvona e cânfora devido às suas atividades quimioterapêuticas ⁽¹⁶⁾. Além disso, há relatos na literatura de que os monoterpenos também apresentam propriedades antioxidantes ^(9,16).

O limoneno destaca-se por apresentar em sua estrutura dois enantiômeros, os quais são os monoterpenos monocíclicos mais abundantes na natureza: o d-limoneno, que é o composto principal do óleo essencial da casca da laranja e do limão e do óleo essencial da alcaravia; enquanto o l-limoneno é encontrado em ervas como a *Mentha* spp. e em uma variedade de árvores. Considera-se que a função natural principal do limoneno inclua a inibição do crescimento microbiano, especialmente o fúngico ⁽¹³⁾. Este pode ser biotransformado em álcool perílico (POH) através da ação de biocatalisadores microbianos, tanto fúngicos como bacterianos, e por ação de enzimas vegetais. Esses biocatalisadores hidroxilam a posição 7 do limoneno, metabolizando-o em d- e l-álcool perílico, d- e l- aldeído perilla e d- e l- ácido perílico (Figura 1) ⁽¹³⁾.

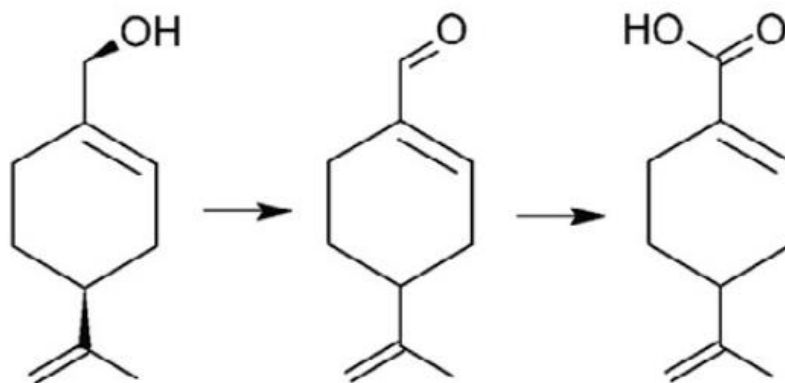


Figura 1. Produtos do metabolismo do limoneno: álcool perílico, aldeído perilla e ácido perílico, respectivamente (Bicas, Fontanille, Pastore, Larroche, 2008)³.

Dentre os monoterpenos com propriedades biológicas relevantes destaca-se o álcool perílico (POH). Este é um monoterpene hidroxilado e que pode ser encontrado em diferentes tipos de óleos essenciais como lavandina, hortelã,

hortelã-pimenta, sálvia, cereja, oxococos, perilla (*Perilla frutescens*), capim-limão, bergamota selvagem, gengibre, alcaravia e sementes de aipo. ^(2,22,33).

As investigações e o interesse médico neste composto concentraram-se inicialmente na terapia anti-neoplásica, onde foi demonstrada sua capacidade de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro*. Gómez-Contreras e colaboradores (2006)¹⁵, por exemplo, avaliaram *in vitro* o efeito do POH na indução de apoptose em células mielomonocíticas humanas U937 e verificaram que esse monoterpene pode eliminar as células tumorais de origem mielóide, concluindo que a apoptose é um importante mecanismo de ação do POH. Além disso, é sugerida uma ação preventiva e terapêutica do POH na tumorigênese a partir dos resultados de uma variedade de modelos tumorais *in vivo*, ao POH induzir a apoptose das células cancerígenas sem afetar as células normais ⁽⁸⁾. Ainda, baseado em estudos pré-clínicos promissores, os estudos com POH avançaram para testes em ensaios clínicos em pacientes com câncer de mama, ovário, colorretal e cerebral. Os resultados mostram que este tratamento a longo prazo associado à quimioterapia é bem tolerado e efetivo sobretudo em pacientes com tumores cerebrais malignos ^(8,14, 31).

Entretanto, estudos recentes têm evidenciado diferentes aspectos de um potencial efeito imunomodulador do POH, o que pode ser interessante na terapêutica de outras desordens não tumorais de origem inflamatória. D'Alessio e colaboradores (2014)¹⁰ avaliaram a capacidade de reparo epitelial do d-limoneno e do POH em modelo animal de lesões cutâneas induzidas pela solução de *Acetato de Tetradecanoilforbol* (TPA) e verificaram que ambas as substâncias reduziram a gravidade e extensão das lesões, além de terem provocado uma diminuição significativa das concentrações séricas de IL-6 e TNF. Nesse estudo, o POH induziu uma melhor regeneração tecidual quando comparado ao d-limoneno e, curiosamente, esta ação foi associada com uma redução na neovascularização. Ainda, o efeito protetor do POH e seu provável mecanismo foram investigados na lesão hepática aguda induzida por etanol em ratos Wistar; neste modelo, o pré-tratamento com POH exerceu atividade antioxidante e capacidade de modular a produção intra-hepática de TNF e a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), essencial regulador da expressão gênica de diversos mediadores inflamatórios ⁽²³⁾.

Portanto, pode-se observar um potencial efeito do POH na modulação da resposta imunoinflamatória. Entretanto, há uma escassez de estudos que demonstrem os mecanismos envolvidos na atividade biológica do POH sobre as células do hospedeiro, as quais estão intimamente envolvidas na patogênese de desordens inflamatórias, incluindo a doença periodontal. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do POH sobre patógenos periodontais e o seu papel na modulação da resposta do hospedeiro sobre os macrófagos, os quais constituem células relevantes do periodonto e representam o protótipo celular envolvido na resposta ao desafio microbiano.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Life Sciences”.

ABSTRACT

Purpose: The study demonstrates an antibacterial activity and effect of perillyl alcohol (POH) on the modulation of the inflammatory response of macrophages in vitro. **Main methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (MBM) of POH on periodontal pathogens were determined by macrodilution and subculture, respectively. The cytotoxicity of POH on RAW 264.7 macrophages was assessed by Trypan Blue and MTS. The effect on cell proliferation was evaluated by Trypan Blue at periods of 24, 48 and 72 hours. The production of reactive oxygen species (ROS) was analyzed by flow cytometry and the M1/M2 profile by the gene expression of TNF and arginase1 by real-time PCR. **Key findings:** POH was effective against *P. gingivalis* (ATCC 33277) and *F. nucleatum* (ATCC 25586) with MIC = 250 µg / mL. Up to 100uM, no cytotoxicity was observed on macrophages. Cell proliferation was inhibited from 48 hours at 100µM (p <0.05) and 250µM (p <0.01). POH increased ROS production at both 10µM and 100µM (p <0.05) in unstimulated cells. PMA-induced production of ROS was not affected by POH, whereas 100 uM significantly reduced LPS-induced ROS. Expression of TNF was not affected by POH in unstimulated cells or in cells polarized to M1 phenotype, whereas both concentrations of POH reduced (p<0.05) the expression of arginase-1 in M2-polarized macrophages. **Significance:** POH has antibacterial activity against periodontal pathogens and reduced proliferation of murine macrophages without significant cytotoxicity at concentrations up to 100µM. In addition, POH did not affect ROS production by macrophages and favored the M1-phenotype, as expression of arginase-1 was inhibited in M2-polarized macrophages.

Keywords: Periodontal disease; Immunomodulation; Macrophages; Natural Products.

Introdução

Nas últimas décadas, avanços na pesquisa periodontal aumentaram o conhecimento sobre a etiopatogenia e os mecanismos imunológicos que norteiam a resposta do hospedeiro frente o desafio microbiano. Assim, apesar do início da periodontite ser dependente da maturação do biofilme periodontopatogênico (composto essencialmente por anaeróbios gram-negativos), sua estabilidade ou progressão é dependente do balanço entre mediadores pro-inflamatórios e protetores, envolvendo interações complexas⁽¹¹⁾.

Neste contexto, alguns tipos celulares participam ativamente no controle da homeostase tecidual do microambiente periodontal, incluindo os macrófagos, os quais são altamente prevalentes no sítio acometido pela doença periodontal, e, na função de apresentadora de antígenos, representam o protótipo celular envolvido na resposta ao desafio microbiano⁽²⁰⁾. Macrófagos ativados ainda secretam citocinas importantes na imunorregulação da degradação da matriz extracelular e na reabsorção óssea na doença periodontal^(22,28,37).

A depender do microambiente inflamatório, podem existir diferentes subpopulações de macrófagos, dentre elas, os macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2), denominados de acordo com o estímulo indutor da s polarização e o perfil de citocinas liberadas. A caracterização das subpopulações de macrófagos pode ser útil na criação de novas estratégias de tratamento de desordens inflamatórias, utilizando a modulação dos macrófagos como alvo terapêutico⁽⁴⁾.

Tem crescido o interesse na utilização de produtos naturais como terapia complementar de diferentes doenças infecto-inflamatórias, como a doença periodontal^(19,24,34). Dentre esses produtos destacam-se os óleos essenciais, que são líquidos voláteis aromáticos extraídos de plantas e conhecidos como ingredientes ativos na fitoterapia⁽³⁴⁾. Os monoterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais e a maioria das investigações sobre a sua ação na saúde humana foram realizadas com o limoneno, carvona cânfora e álcool perílico (POH). O POH pode ser encontrado em diversos óleos essenciais^(2,25,40) e as investigações e o interesse médico neste composto concentraram-se inicialmente na sua terapia anti-tumoral^(6,13,16,18,36).

Entretanto, estudos recentes têm evidenciado um potencial efeito imunomodulador do POH, o que pode ser interessante na terapêutica de outras desordens não tumorais de origem inflamatória. D'Alessio e colaboradores (2014)⁹ relataram a ação do POH na melhora da cicatrização de feridas, provavelmente mediada pela redução das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF. Ainda, o efeito protetor do POH e seu provável mecanismo foram investigados na lesão hepática aguda induzida por etanol em ratos Wistar, o qual exerceu atividade antioxidante e modulou negativamente a produção de TNF e a ativação de NF-κB, essencial regulador da expressão gênica de diversos mediadores inflamatórios⁽²⁶⁾. Além disso, foi demonstrada recentemente a atividade antinociceptiva do POH em modelo de dor orofacial de camundongos, sugerindo seu potencial para o desenvolvimento de formulações que atuem no tratamento dessas desordens⁽³⁹⁾.

Portanto, apesar das evidências do potencial imunomodulador do POH, há uma escassez de estudos que demonstrem os mecanismos envolvidos na atividade biológica do POH sobre as células do hospedeiro, as quais estão intimamente envolvidas na patogênese de desordens inflamatórias, incluindo a doença periodontal. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel do POH na modulação da resposta do hospedeiro sobre os macrófagos como protótipo celular envolvido na resposta ao desafio microbiano, bem como sua atividade antimicrobiana sobre patógenos periodontais.

Materiais e Métodos

Determinação da atividade antimicrobiana contra patógenos periodontais

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado de acordo com o método M11-A5 de macrodiluição em caldo do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), com algumas modificações⁽⁷⁾. O inóculo bacteriano foi preparado com a suspensão de colônias de *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) em 5 ml de caldo BHI – Brain Heart Infusion - suplementado com hemina (5 µg/mL) e menadiona (1 µg/ml de vitamina K), seguido de incubação em condições anaeróbicas (90% de N₂ e 10% de CO₂) a 37 ° C durante 48 h. Após o período de incubação, o inóculo foi ajustado para 1,5x10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A solução estoque do POH (50 mg/mL) foi esterilizada por membrana filtrante (0,22 µm) e preparada usando

DMSO a 4% como solvente. Foram utilizadas concentrações crescentes (0,00781-1 mg/mL) do POH para os testes e gluconato de clorexidina a 0,12% (Colgate® Periogard) como controle. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através da observação da média de turbidez e/ou presença de sedimento. Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), os tubos de ensaio sem crescimento visível na determinação da CIM tiveram 10µL plaqueados em ágar sangue suplementado com hemina (5 µg/mL) e menadiona (1 µg/mL de vitamina K) e incubados sob condições anaeróbias (90% de N₂ e 10% de CO₂) a 37 ° C por 72 h para determinar o CBM. Os experimentos foram realizados em triplicata e de forma independente.

Linhagem celular e preparação do Álcool Perílico

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC #TIB-71), a qual foi obtida comercialmente. Esta linhagem é amplamente utilizada na literatura, sendo responsiva ao LPS e PMA, bem como à polarização induzida por LPS e IFN- γ (M1) e IL-4 (M2) ^(30,42,46). Além disso, estudos demonstram a viabilidade da utilização de experimentos de co-cultura para diferenciação de osteoclastos, o que valida o uso desta linhagem de macrófagos como precursoras desse tipo celular ^(45,46). O uso de células provenientes de roedores facilita a avaliação e expansão dos resultados *in vitro* para futuros estudos em um modelo *in vivo* para o estudo das doenças periodontais.

As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado por calor, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e mantida em atmosfera umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂. O (S)-(-)-álcool perílico, 96%, foi obtido da Sigma Aldrich Chemical Co. (U.S.A.). Uma solução estoque (25mM) foi preparada em FBS, a qual foi diluída em meio DMEM nas concentrações finais de 10µM, 25µM, 50µM, 100µM e 250µM para utilização nos experimentos.

Ensaio de citotoxicidade: Azul de Trypan e MTS

A citotoxicidade do POH foi avaliada pelo teste de exclusão de Azul de Trypan e pelo ensaio de MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2Htetrazólico)). As células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas nas densidades de 1×10^5 e 5×10^4 células/poço para o teste de azul de trypan e MTS, respectivamente, em placas de 96 poços e estimuladas na presença de POH nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M por 24 horas. O controle negativo foi constituído por células não estimuladas e o controle positivo pela camptotecina (Sigma-Aldrich) a 6 μ M. O teste de exclusão de azul de trypan consiste em um método colorimétrico que se baseia na contagem diferencial de células viáveis e não viáveis pela integridade da membrana citoplasmática com o corante azul de trypan 0.4% - Gibco™. Após o período experimental, as células foram ressuspensas na proporção de 1:1 com o azul de trypan e submetidas à contagem após 2 minutos de incubação em hemocitômetro por um examinador treinado em microscópio invertido. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao número total.

O ensaio de MTS determina o número de células viáveis através da atividade de enzimas desidrogenase mitocondrial, as quais reduzem a solução de substrato contendo tetrazólio para o formazan, gerando uma reação colorimétrica^(3,8) e foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Após o período experimental, adicionou-se 20 μ L do reagente contendo o sal de tetrazólio (MTS) em cada poço e, em seguida, a placa foi incubada por 1h a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. A seguir, foi realizada a medição da absorbância a 490nm em espectrofotômetro (Bio-Rad Inc., model 550) e, a partir dos dados obtidos, a atividade enzimática no grupo do tratamento foi calculada através de porcentagem em relação aos respectivos controles negativos de cada período experimental.

Ensaio de proliferação celular

O efeito do POH na proliferação de macrófagos foi investigado pelo ensaio de exclusão do corante Azul de Trypan. As células da linhagem RAW 264.7 foram plaqueadas na densidade 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e estimuladas na presença de POH nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. O controle negativo foi constituído pelas células não estimuladas e o controle positivo pela mitomicina a 10 μ g/mL (Sigma-Aldrich).

Após o período experimental, as células foram ressuspensas na proporção de 1:1 com o azul de trypan a 0.4% (Gibco™) e submetidas à contagem diferencial entre células viáveis (não coradas) e mortas (azuis) após 2 minutos de incubação em hemocitômetro por um examinador treinado em microscópio invertido. Os resultados foram expressos como porcentagem de células vivas em relação ao número total.

Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O efeito do POH sobre a produção de ROS em macrófagos foi avaliado através de citometria de fluxo. Neste ensaio, os macrófagos foram plaqueados em placas de 6 poços (3×10^5 células por poço). Após 24h para recuperação do processo de dissociação enzimática e adesão das células ao substrato plástico de cultura, o meio de cultura foi removido, as células lavadas gentilmente com PBS (pH 7.4, sem Ca e Mg) por 2 vezes e foi acrescentado PBS contendo 10 μ M do reagente 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (cat# C400, Molecular Probes/ThermoFisher Scientific), etanol e DMSO. Após incubação à 37°C por 30 minutos para internalização do reagente, este foi removido e as células foram tratadas com POH nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M por 30 minutos, seguido do estímulo com 50 ng/mL de phorbol myristil-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, cat#P1585) e 10mg/mL de LPS (E coli, serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich, cat#L4130) por 20 minutos para indução da produção de ROS.

Na presença de ROS no meio intracelular, o reagente 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato sofre oxidação e passa a emitir fluorescência

no canal 'verde' (FITC/FL1) quando excitado por luz UV ou pelo laser azul do citômetro (488 nm), enquanto nas células que não produziram ROS não ocorre a oxidação do reagente e não há emissão de fluorescência com a excitação das células. A aquisição dos dados foi realizada em um mínimo de 10,000 eventos por amostra em citômetro de fluxo (BD FACSVerse, BD Biosciences). Estes experimentos foram realizados três vezes de forma independente, utilizando diferentes passagens da linhagem celular. Os dados obtidos foram expressos sob a forma de porcentagem de células positivas para ROS.

Expressão gênica de TNF e arginase : PCR em Tempo Real.

A investigação da atividade do POH sobre a polarização de macrófagos M1/M2 foi avaliada pela análise da expressão gênica de TNF e arginase pela técnica de PCR em Tempo Real. Para isto, os macrófagos foram plaqueados em placas de 6 poços (3×10^5 células/placa). Após 4 horas para recuperação do processo de dissociação enzimática e adesão das células ao substrato plástico de cultura, estas foram tratadas com POH nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M por 24 horas. Os macrófagos foram então tratados com M-CSF (50 ng/mL, Peprotech) e, em 24 h, polarizadas para o fenótipo M1 (tratamento com LPS, 1 μ g/mL, Sigma Aldrich; e IFN- γ , 1 μ g/mL, Peprotech) ou para o fenótipo M2 (tratamento com IL-4, 1 μ g/mL, Peprotech). Ao final do período de polarização de 24 h, as células aderidas foram coletadas e o RNA total obtido utilizando um sistema de colunas de afinidade para o isolamento e purificação do RNA total, incluindo tratamento com DNase (RNeasy Micro kit, Qiagen). A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm, respectivamente. 300 ng de RNA total foram utilizados para a síntese do DNA complementar (cDNA) na reação de transcriptase reversa segundo as instruções do fabricante (Applied Biosystem). Em seguida, foi realizada a reação de polimerase em cadeia em tempo real (PCR Real Time), para a quantificação dos níveis de mRNA no StepOne Plus RealTime PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK) utilizando o sistema de quantificação Taqman (Applied Biosystems, Warrington, UK). Como controle endógeno, foi utilizado um par de

primers para o gene constitutivo GAPDH. O nível de nível relativo da expressão gênica foi determinado utilizando o método ($\Delta\Delta Ct$).

Análise estatística

Antes da análise, a normalidade dos dados foi comprovada através do teste de Shapiro-Wilk. Para comparações entre os grupos experimentais, foi utilizado o ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. Os dados estão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão e as análise realizadas no programa estatístico GraphPad versão 7.00, usando um nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

Resultados

Determinação da atividade antimicrobiana contra patógenos periodontais

A Tabela 01 mostra os resultados da atividade antimicrobiana do POH e da clorexidina contra os patógenos periodontais examinados. A substância apresentou atividade antimicrobiana moderada contra *P. gingivalis* e *F. nucleatum* sob a mesma concentração (CIM 250 $\mu\text{g/ml}$) e a CBM para ambos os microrganismos coincidiu com a CIM.

Tabela 01. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dadas em $\mu\text{g/mL}$ do POH e clorexidina a 0,12% (controle) contra microrganismos anaeróbios estritos.

Substâncias	<i>P. gingivalis</i>		<i>F. nucleatum</i>	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
POH	250	250	250	250
Clorexidina	1.875	1.875	3.75	3.75

Ensaio de citotoxicidade e proliferação celular

Os valores apresentados na Figura 1 demonstram que a estimulação com POH nas concentrações testadas pelo período de 24 horas não influenciou a viabilidade das células RAW 264.7, conforme determinado pelo ensaio de exclusão do corante azul de trypan. O controle positivo (camptotecina) reduziu significativamente a viabilidade celular no período testado, com uma porcentagem de células viáveis de 54,75%.

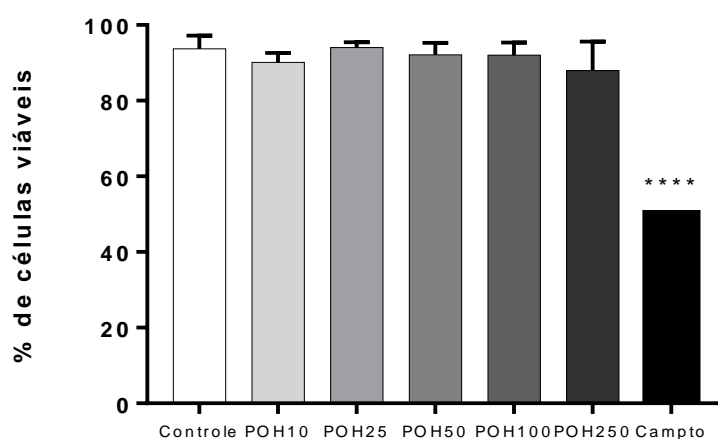


Figura 1 – Efeito do POH sobre a viabilidade de macrófagos. As células RAW 264.7 foram tratadas com as concentrações indicadas de POH (10-250uM) e cultivadas *in vitro* durante 24 horas. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de azul de trypan. As barras representam as médias e as linhas verticais os desvios-padrões de três experimentos independentes. O asterisco (*) indica diferença significativa em comparação com o controle negativo (ANOVA e *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$).

Para o ensaio de MTS, as células RAW 264.7 foram tratadas com as concentrações indicadas do POH (10-250µM) durante 24h. O valor médio da absorbância do controle negativo foi ajustado para 100% e os resultados para as células tratadas com o POH estão apresentados como variação relativa ao controle negativo (Figura 2). A estimulação com POH não produziu alterações na viabilidade celular até a concentração de 100µM, enquanto a concentração de

250 μ M causou citotoxicidade significativa, reduzindo o percentual de células viáveis para 72,94% em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). O controle positivo (camptotecina) reduziu significativamente ($p < 0,01$) a atividade mitocondrial da linhagem celular estudada, indicando a sensibilidade do ensaio.

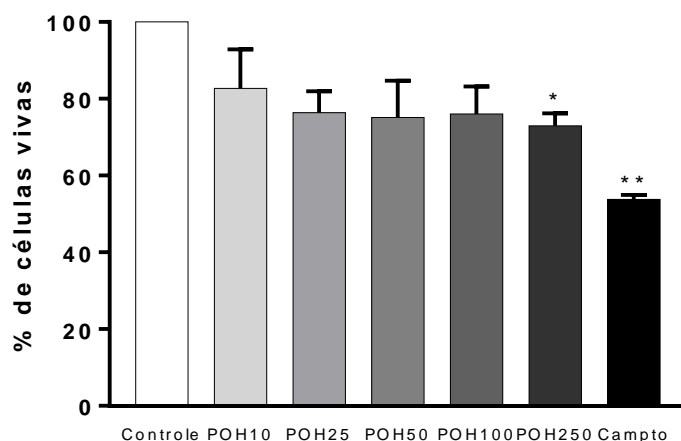


Figura 2 – Citotoxicidade do POH (10-250 μ M) em células RAW 264.7 tratadas pelo período de 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTS, 1 hora após a adição do reagente contendo o sal de tetrazolium (MTS). O valor médio da absorbância do controle negativo foi ajustado para 100% e os resultados para as células tratadas com o POH estão apresentados como variação relativa. A figura é representativa de pelo menos três experimentos independentes. O asterisco (*) indica diferença significativa em comparação com o controle negativo (ANOVA e post hoc de Tukey, $p < 0,05$).

Ensaio de proliferação

O ensaio de proliferação foi realizado pelo método do azul de trypan para avaliação do efeito do POH nas concentrações testadas (10-250 μ M) sobre a viabilidade de células RAW 264.7 nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Neste ensaio, foi verificada atividade inibitória do POH sobre a proliferação de macrófagos a partir das 48 horas, a qual foi mais acentuada nas concentrações de 100 μ M (períodos de 48 e 72 horas – $p < 0,05$) e 250 μ M (período de 72 horas, $p < 0,05$) (Figura 3). O controle positivo (mitomicina) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade celular nos três períodos avaliados.

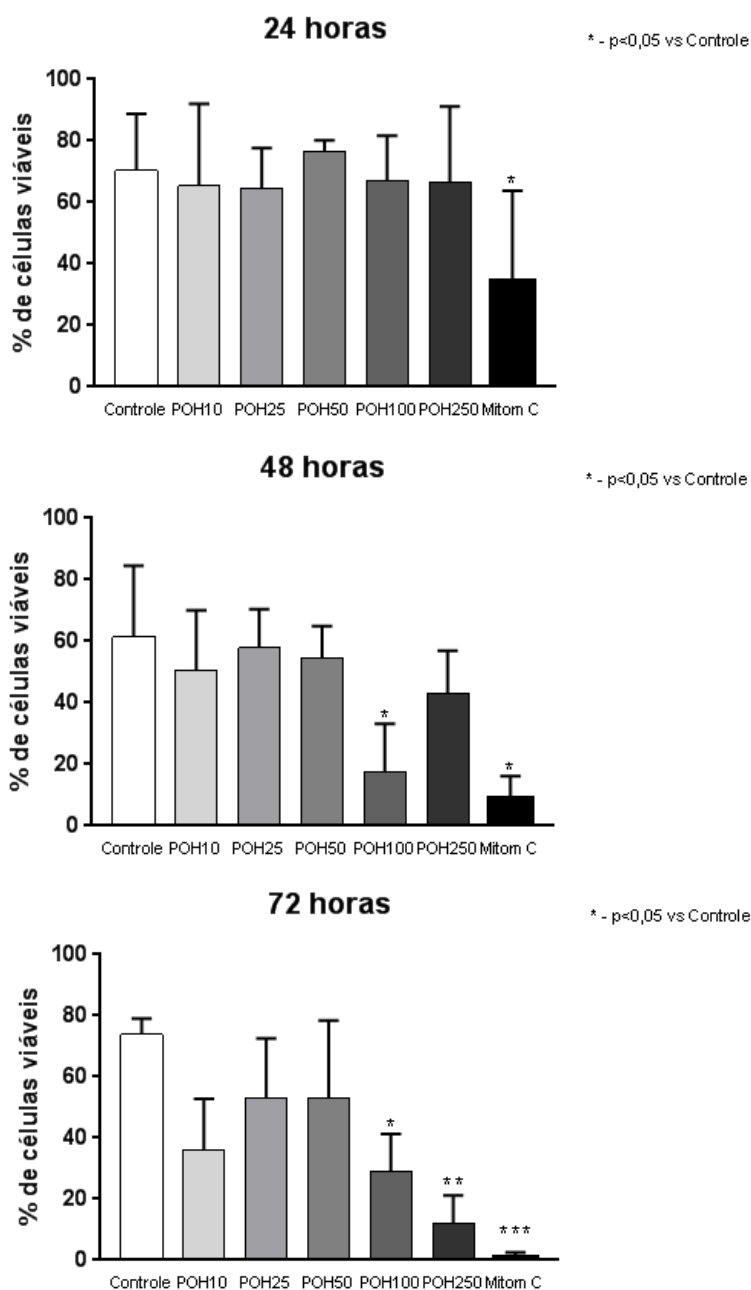


Figura 3 - Efeito do POH na proliferação de células RAW 264.7 cultivadas *in vitro* pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. As células foram tratadas com as concentrações indicadas de POH (10-250 μ M) e a proliferação foi determinada pelo ensaio de azul de trypan. As barras representam as médias e as linhas verticais os desvios-padrões de três experimentos independentes. O asterisco (*) indica diferença significativa em comparação com o controle negativo (ANOVA e *post hoc* de Tukey, p<0,05).

Com estes ensaios de viabilidade e proliferação, procurou-se determinar a maior concentração não citotóxica do POH para uso nos experimentos

subsequentes, tendo em vista que os efeitos biológicos dessa substância podem estar relacionados aos seus efeitos citotóxicos. Dessa forma, foram selecionadas as concentrações de 10 μ M e 100 μ M para avaliar possíveis efeitos relacionados à dose nos demais desfechos investigados.

Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Os resultados do experimento avaliando o efeito do POH sobre a produção de ROS por macrófagos indicam que, na presença do PMA, o POH não influencia a produção de ROS pelos macrófagos em nenhuma das concentrações testadas (10 μ M e 100 μ M) (Figura 4). Já na presença do LPS, observou-se que o efeito do POH na produção de ROS parece ser dependente da concentração, visto que o POH a 10 μ M tem efeito sinérgico ao LPS na produção de ROS, provocando um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$), e na concentração de 100 μ M este efeito é antagonista, ocorrendo uma redução significativa da produção de ROS ($p < 0,05$), comparado ao tratamento apenas com LPS (Figura 5).

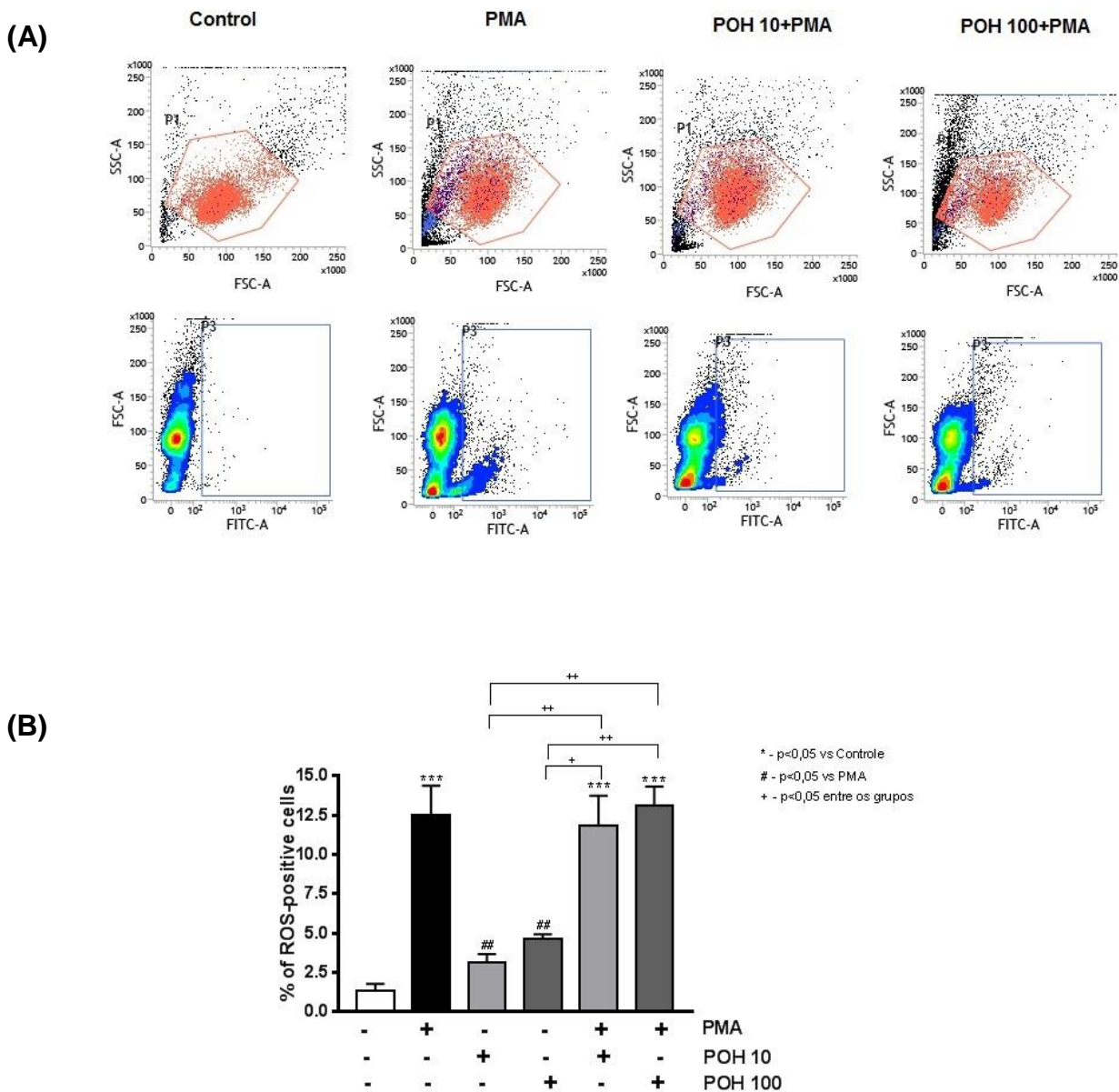


Figura 4 – Efeito do POH sobre a produção de ROS na presença de PMA. Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram tratados com POH nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M seguido do estímulo com 50 ng/mL de PMA e a produção de ROS foi avaliada por citometria de fluxo pela medida da oxidação de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato que passa a emitir fluorescência no canal 'verde' (FITC) (A-B). (A) Porcentagem de células positivas para ROS. (B) Plots representativos da citometria de fluxo mostrando a produção de ROS. As diferenças estatísticas são baseadas no teste ANOVA com *post-hoc* de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus controle ou como indicado na figura.

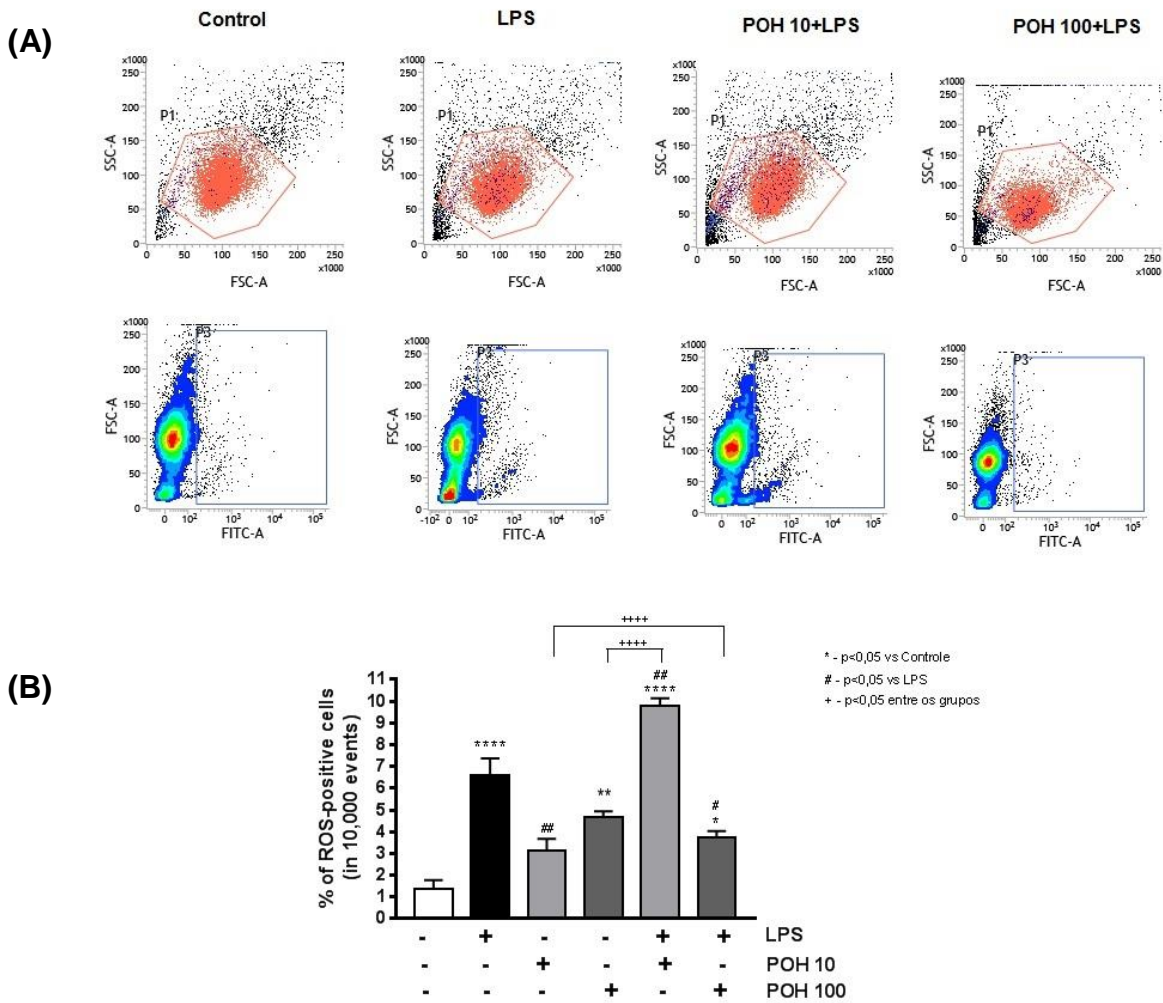


Figura 5 – Efeito do POH sobre a produção de ROS por macrófagos da linhagem RAW 264.7 na presença de LPS... As células foram tratadas com POH nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M seguido do estímulo com 10mg/mL de LPS e a produção de ROS foi medida por citometria de fluxo pela medida da oxidação de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato que passa a emitir fluorescência no canal 'verde' (FITC) (A e B). (A) Porcentagem de células positivas para ROS. (B) Plots representativos da citometria de fluxo mostrando a produção de ROS. As diferenças estatísticas são baseadas no teste ANOVA com *post-hoc* de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus controle ou como indicado na figura.

Imunofenotipagem

Os dados do ensaio da indução de polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e M2 após tratamento com o POH (10 μ M e 100 μ M) indicam que o POH isoladamente não apresenta efeito sobre a polarização para nenhum dos fenótipos. Os níveis de expressão gênica de TNF mostraram um discreto efeito indutor de M1 na concentração de 10 μ M, o qual não foi observado para a concentração de 100 μ M (Figura 6). Porém, os níveis de expressão gênica de arginase 1 demonstraram um efeito inibidor do fenótipo M2 em ambas as concentrações testadas (Figura 7).

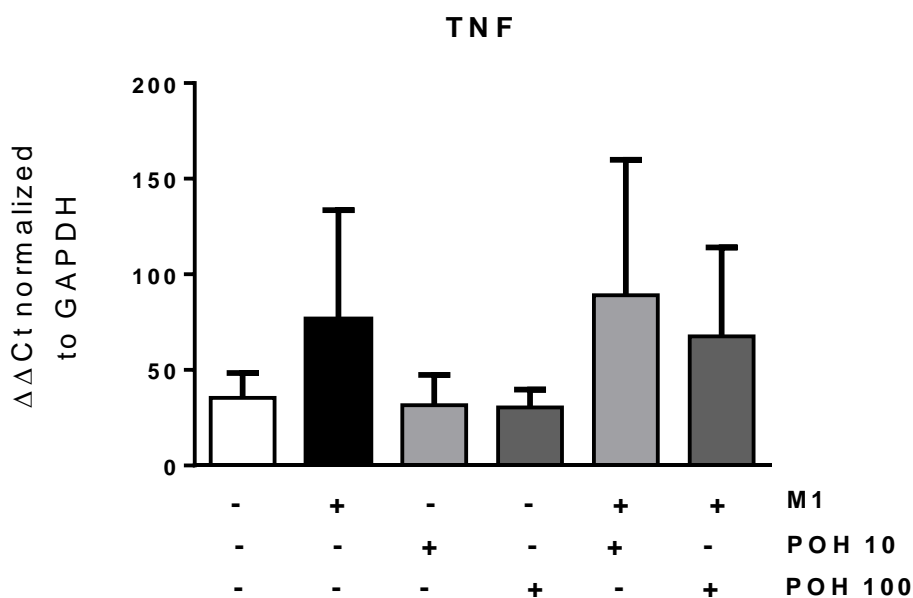


Figura 6 - Expressão gênica (RNAm) de TNF avaliada por RT-qPCR em RAW 264.7. A indução da polarização M1 foi realizada mediante o tratamento de macrófagos com LPS *E. coli* (1 μ g/mL) e IFN- γ (1 μ g/mL) associados ou não ao POH nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M. Colunas representam as médias e as barras verticais os desvios-padrões para dois experimentos independentes.

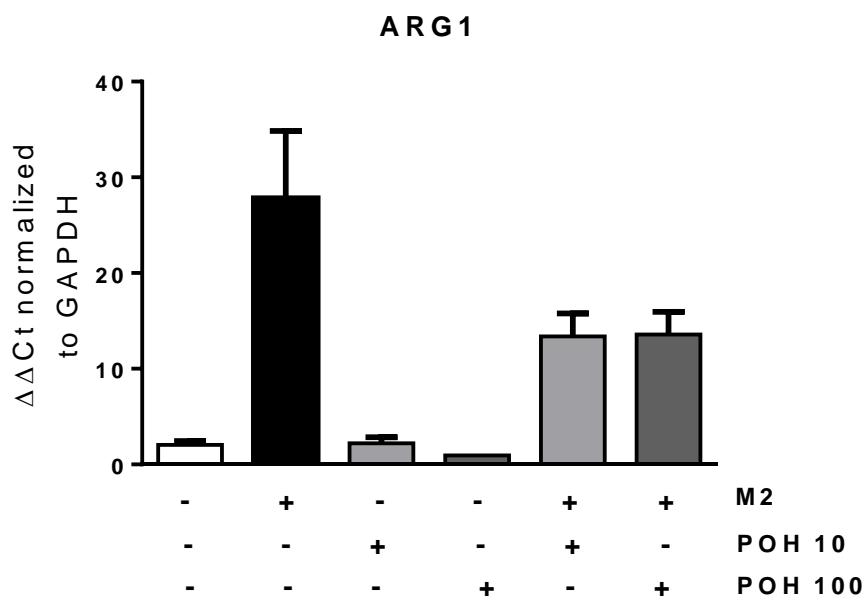


Figura 7 - Expressão gênica (RNAm) de arginase avaliada por RT-qPCR em RAW 264.7. A indução da polarização M2 foi realizada mediante tratamentos de macrófagos com IL-4 (1µg/mL) associados ou não ao POH nas concentrações de 10µM e 100µM. Colunas representam as médias e as barras verticais os desvios-padrões para dois experimentos independentes.

Discussão

O álcool perílico (POH) é um monoterpeno natural encontrado em vários tipos de óleos essenciais e que apresenta uma atividade antitumoral bem consolidada na literatura, suportada por pesquisas *in vitro*, *in vivo* e até mesmo por ensaios clínicos fase II em pacientes com câncer ^(1,2,4,16,25,40). Estudos recentes têm sugerido que o POH também apresenta atividade na modulação da resposta imunoinflamatória ^(9,26). Entretanto, os mecanismos pelos quais o POH exerce essa atividade biológica sobre as células do hospedeiro não são completamente elucidados e merecem maiores investigações.

Além disso, não há relatos na literatura a respeito da atividade antibacteriana do POH contra patógenos periodontais, sendo o nosso estudo o primeiro a constatá-la. O POH apresentou CIM e CBM de 250 µg/mL para *P. gingivalis* e *F. nucleatum*. Quando produtos naturais apresentam valores de CIM's entre 100 e 500µg/mL, estes são considerados inibidores moderados da atividade

microbiana ⁽²³⁾. Sendo assim, os resultados do teste da macrodiluição são animadores, porém são necessárias investigações contra outros anaeróbios estritos, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, além de ensaios sobre biofilme, para consolidar a atividade antibacteriana do POH contra patógenos periodontais.

A citotoxicidade do POH já havia sido estudada sobre células envolvidas no processo inflamatório, como as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano, e constatou-se que esse composto, solubilizado em meio de cultura contendo 10% de FBS e em contato com as células por 96 horas, não alterou a viabilidade desse tipo celular nas concentrações analisadas (0.625-5mM), de acordo com o ensaio laranja de acridina/brometo de etídio ⁽³³⁾. Gerhäuser e colaboradores (2003)¹⁴ realizaram uma triagem de possíveis agentes quimiopreventivos frente à células RAW 264.7 e relataram que a IC₅₀ do POH, o qual foi diluído em 10% de DMSO, foi superior a 50µM. Corroborando com estes dados, o presente estudo, o demonstrou que o POH até a concentração de 100µM não interferiu na viabilidade de macrófagos RAW 264.7, enquanto que a concentração de 250µM mostrou-se citotóxica diante do ensaio de MTS, reduzindo a viabilidade celular de forma significativa (p<0,05) em relação ao controle negativo.

Poucos são os estudos sobre o efeito do POH sobre a proliferação celular e estes têm apresentado resultados controversos, o que pode ser decorrente de diferenças na abordagem experimental, como as concentrações testadas e tipos celulares analisados. No estudo de Toro-Arreola e colaboradores (2005)¹⁰ foi observado que este monoterpene a 0.025µM induziu parcialmente a proliferação de linfócitos obtidos de camundongos portadores de linfoma e que, em concentrações mais elevadas, apresentou efeito inibitório. Em contrapartida, o tratamento de linfócitos do sangue periférico humano com POH nas concentrações de 0, 0.625, 1.25, 2.5 ou 5mM resultou em uma inibição de proliferação dose-dependente ⁽³³⁾.

Por sua vez, a administração intranasal do POH (84µg/dia) em ratos saudáveis, duas vezes ao dia, levou a um aumento da porcentagem de macrófagos alveolares em 82% ⁽³²⁾. Os dados do estudo mostram que o POH inibiu a proliferação de macrófagos a partir das 48 horas, sendo este efeito mais

acentuado nas concentrações de 100uM (nos períodos de 48 e 72 horas, $p < 0,05$) e 250µM (período de 72 horas, $p < 0,05$). Essa atividade inibitória pode ser considerada positiva visto que, apesar da importância do recrutamento de células inflamatórias da imunidade inata para o controle inicial da infecção, um excesso de ativação dessa resposta pode resultar em destruição tecidual, sendo importante essa regulação da proliferação celular para o balanço da resposta imune.

Como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um indicador importante da resposta biológica de macrófagos a fatores externos e também um mecanismo envolvido na indução de morte de microrganismos fagocitados⁽¹²⁾, foram avaliados os efeitos do POH na produção de ROS pelos macrófagos. Evidências mostram que esse composto é um potente modulador da atividade de ROS, apresentando tanto atividade pró como antioxidante^(15, 43). Os nossos achados corroboram com estes dados e mostram que o efeito do POH na produção de ROS parece ser dependente da concentração, visto que a 10µM tem ação sinérgica ao LPS e a 100µM esse efeito é antagonista, ocorrendo uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de ROS, comparado ao LPS isolado. No entanto, o POH isolado não interferiu na produção de ROS, sugerindo que é necessário um microambiente inflamatório para que a substância apresente esse comportamento indutor/inibidor, a depender da concentração. No entanto, nenhum efeito sobre a produção de ROS foi observado na presença do PMA isolado ou associado ao POH. A partir desse resultado, podemos sugerir que a ação do POH sobre a produção de ROS ocorre pela ativação da via dos receptores tipo Toll (TLRs), sendo o LPS (um dos principais padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) reconhecido especificamente via TLR4⁽³⁸⁾. Em contrapartida, o PMA induz a produção de ROS por meio da ativação da via da proteína quinase C α (PKC α)⁽²⁷⁾. Como não observamos nenhum efeito do POH na presença de PMA, apenas do LPS, pode-se inferir que, a produção de ROS na linhagem RAW 264.7 não foi modulada via PKC α e sim pela via de TLR4.

Nesse estudo foi demonstrada pela primeira vez a ação do POH na polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e M2. Os macrófagos estão entre as primeiras células imunes a responder a estímulos bacterianos e, de acordo com o perfil das citocinas compondo o microambiente da infecção, estes

são preparados para reagir de diferentes maneiras ⁽²⁹⁾. Macrófagos *naive* sob a presença de citocinas, como IFN- γ , TNF ou LPS, outros estímulos patogênicos e sinais de perigo endógeno, diferenciam-se em macrófagos tipo I (M1). Esta ativação é denominada de “ativação clássica” e se caracteriza por apresentar ação microbicida, antiproliferativa e citotóxica, devido à produção de ROS, de NO e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF) ^(17, 28, 41). Neste contexto, macrófagos M1 estão fortemente associados à fase inicial da doença periodontal, visto que biofilmes bacterianos acumulados na área gengival dos elementos dentários ativam esses mediadores pró-inflamatórios ⁽³⁵⁾.

Por outro lado, um microambiente rico em IL-4, IL-10, IL-13, induz a diferenciação de macrófagos *naive* para um fenótipo tipo II (M2), o qual apresenta caráter anti-inflamatório, funções imunossupressoras e capacidade aumentada para promover a proliferação e atividade de deposição de colágeno de linhagens celulares fibroblásticas ⁽⁴¹⁾. Além disso, devido ao metabolismo da arginase, este subtipo de macrófago promove melhor cicatrização de lesões ⁽²¹⁾. Esta ativação é denominada de “ativação alternativa” e resulta em grande produção de IL-10 e TGF β , mas níveis extremamente baixos de IL-12. Como os macrófagos M2 surgem em resposta à persistência crônica de atividades pró-inflamatórias que prejudicam o tecido, sua ação constitui neste quadro crônico um mecanismo para regular a inflamação e recuperar a sua homeostase ⁽⁴¹⁾. Dessa forma, o fenótipo M2 pode ser associado à fase de reparo tecidual da doença periodontal.

Nesse contexto, os resultados do presente estudo mostraram que o POH na concentração de 10 μ M induziu discretamente a polarização para o fenótipo M1, indo ao encontro dos resultados obtidos no ensaio de ROS, no qual essa mesma concentração provocou o aumento dos níveis deste agente. Porém, na concentração de 100 μ M, não foi observado esse efeito indutor de polarização M1, o que é refletido na redução significativa da produção de ROS nessa concentração comparado ao controle ($p < 0,05$). Sendo assim, o POH na concentração de 10 μ M parece apresentar um efeito microbicida, pelo fato de induzir a polarização para o fenótipo M1 e o aumento significativo ($p < 0,01$) na produção de ROS. Por outro lado, a expressão gênica de arginase foi reduzida tanto nas concentrações de 10 μ M como de 100 μ M, demonstrando que o POH inibe a polarização para o fenótipo M2.

Apesar da polarização de macrófagos parecer um processo simples, este é muito mais complexo no organismo, principalmente pelo fato de macrófagos apresentarem alta plasticidade, sugerindo que este processo de polarização é dinâmico e que as duas populações podem estar presentes tanto na fase de indução como de reparo da inflamação ⁽³¹⁾. Isso indica que, mesmo o POH apresentando efeito inibidor da polarização M2, também apresenta importância na fase de reparo tecidual da doença periodontal visto que macrófagos M1 também podem estar presentes no estágio de resolução da inflamação. Outro ponto positivo que pode ser observado no efeito indutor de polarização para o fenótipo M1 no contexto da doença periodontal é que foi demonstrado recentemente que a transferência adotiva de macrófagos M1 em camundongos previamente submetidos à indução da doença periodontal por ligadura promoveu uma redução da perda óssea alveolar nesses animais, sugerindo um papel protetor de M1 neste processo ⁽⁴⁴⁾. Neste contexto, a discreta polarização M1 e o significativo aumento dos níveis de ROS pelo POH a 10µM, aliado à inibição do fenótipo M2 observadas *in vitro* se mostram interessantes e incentivam maiores investigações sobre o papel imunomodulador do POH na periodontite experimental.

Conclusão

De acordo com esses dados, podemos demonstrar efeito antibacteriano contra patógenos periodontais e imunomodulador do POH sobre a proliferação, ativação e polarização de macrófagos. A atividade sobre outros periodontopatógenos, bem como com em outros tipos celulares, como os osteoclastos, além de estudos *in vivo* em modelo de doença periodontal são necessários para melhor elucidar o papel do POH na modulação da resposta imunoinflamatória na periodontite.

Referências

1. Bailey HH, Attia S, Love RR, Fass T, Chappell R., Tutsch K, *et al.*, Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 jun; 62(1): 149-57.
2. Belanger JT. Perillyl alcohol: Applications in oncology. *Altern Med Rev.* 1998 dez; 3(6): 448-57.
3. Berridge MV, Tan AS. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993 jun; 303(2): 474–82.
4. Chaudhary SC, Alam MS, Siddiqui MS, Athar M. Perillyl alcohol attenuates Ras-ERK signaling to inhibit murine skin inflammation and tumorigenesis. *Chem Biol Interact.* 2009 mai 15; 179(2-3): 145-53.
5. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages. *Front Immunol,* 2015 mai 26; 6: 1-15.
6. Chen TC, Fonseca CO, Schönthal A.H. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. *Am J of Cancer Res.* 2015; 5(5): 1580-93.
7. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard. 7th edition, M11-A5. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2007.
8. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991 Jul; 3(7): 207-12.
9. D'alessio PA, Mirshahi M, Bisson JF, Béné MC. Skin Repair Properties of *d*-Limonene and Perillyl Alcohol in Murine Models. *Antinflamm AntiAllergy Agents Med Chem.* 2014 mar; 13(1): 29-35.

10. Del Toro-Arreola S, Flores-Torales E, Torres-Lozano C, Del Toro-Areola A, Tostado-Pelayo K, Ramirez-Dueñas MG, *et al.* Effect of d-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *Int Immunopharmacol.* 2005 mai; 5(5): 829-38.
11. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000.* 2013 fev; 61(1): 16-53.
12. Dupré-Crochet S, Erard M, Nübe O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol.* 2013 out; 94(4): 657-70.
13. Elegbede JA, Flores R, Wang RC. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. *Life Sci.* 2003 Oct 17; 73(22): 2831-40.
14. Gerhäuser G, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J, *et al.* Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2003 fev-mar; 523–524: 163–172.
15. Gomes AC, Mello AL, Ribeiro MG, Garcia DG, Da Fonseca CO, Salaza MD, *et al.* Perillyl alcohol, a pleiotropic natural compound suitable for brain tumor therapy, targets free radicals. *Arch Immunol Ther Exp.* 2017 ago; 65(4): 285-297.
16. Gómez-Contreras PC, Hernández-Flores G, Ortiz-Lazareno PC, Toro-Arreola S, Delgado-Rizo V, Lerma-Díaz, *et al.* In vitro induction of apoptosis in U937 cells by perillyl alcohol with sensitization by pentoxifylline: increased BCL-2 and BAX protein expression. *Chemotherapy.* 2016 set 29; 52(6): 308-15.
17. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 jan; 3(1): 23-35.
18. Grabmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* 2005; 72: 505-35.
19. Guimarães MR, Coimbra LS, Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa Júnior C. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res,* 2011 abr; 46(2): 269-79.
20. Hassel TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000.* 1993 out; 3(1): 9-38.

21. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001 dez 1; 167(11): 6533-44.
22. Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun.* 2014 out; 82(10): 4190-203.
23. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
24. Jayash SN, Hashim NM, Misran M, Baharuddin NA. *In vitro* evaluation of osteoprotegerin in chitosan for potential bone defect applications. *PeerJ.* 2016 ago 23; 1-19.
25. Kelloff GJ, Boone CW, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Doody LA, *et al.* New agents for cancer chemoprevention, *J Cell Biochem.* 1996; 26: 1-28.
26. Khan AQ, Nafees S, Sultana S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NFK-B activation and proinflammatory cytokine production. *Toxicology.* 2011 jan 11; 279: 108-14.
27. Kohl R, PreiB S, von Knethen A, Brüne B. Oxidized low-density lipoprotein depletes PKC α and attenuates reactive oxygen species formation in monocytes/macrophages. *Cardiovascular Research* 2006 ago 1; 71(3): 574-85.
28. Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Holden JA, Lenzo JC, Fong SB, Reynolds EC. Unprimed, M1 and M2 Macrophages Differentially Interact with *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS ONE.* 2016 jul 6; 11(7): 1-17.
29. Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Brammar GC, Walsh KA, *et al.* Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol.* 2014 set; 193(5): 2349-62.
30. Matsebatlela TM, Anderson AL, Gallicchio VS, Elford H, Rice CD. 3,4-Dihydroxy-benzohydroxamic acid (Didox) suppresses pro-inflammatory profiles and oxidative stress in TLR4-activated RAW264.7 murine macrophages. *Chem Biol Interact.* 2015 mai 25; 233: 95-105.

31. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, *et al.* Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005 dez; 142(3): 481–9.
32. Salazar MD, Silva RF, Da Fonseca CO, Lagrota-Candido J, Quirico-Santos T. Intranasal Administration of Perillyl Alcohol Activates Peripheral and Bronchus-Associated Immune System In Vivo. *Arch Immunol Ther Exp.* 2014 fev; 62(1): 59-66.
33. Schulz S, Bühling F, Ansorge S. *Prenylated* proteins and lymphocyte proliferation: inhibition by d-limonene and related monoterpenes. *Eur J Immunol.* 1994 fev; 24(2): 301-307.
34. Shojaei S, Kiumarsi A, Moghadam AR, Alizadeh J, Marzban H, Ghavami S. Perillyl Alcohol (Monoterpene Alcohol), Limonene. *Enzymes.* 2014 dez; 36(7): 7-32.
35. Shyu KG, Choy CS, Wang DC, Huang WC, Chen SY, Chen CH, *et al.* Change of scaling-induced proinflammatory cytokine on the clinical efficacy of periodontitis treatment. *Scientific World Journal.* 2015 mar 25; 2015: 1-7.
36. Stayrook KR, McKinzie JH, Burke YA, Crowell PL. Induction of the apoptosis-promoting protein Bak by perillyl alcohol in pancreatic ductal adenocarcinoma relative to untransformed ductal epithelial cells. *Carcinogenesis.* 1997 ago; 18(8): 1655-8.
37. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 fev; 15(1): 49-60.
38. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 335-376.
39. Tomaz-Morais JF, Braga RM, de Sousa FB, de Sousa DP, Pordeus LC deM, de Almeida RN, *et al.* Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-)-perillyl alcohol in mice: a randomized, controlled and triple-blind study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 May; 46(5): 662-667.
40. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. *Pharmacognosy.* 9^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.
41. Vega MA, Corbí AL. Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type. *Inmunología.* 2006 out-dez; 25(4): 248-72.

42. Woo CH, Lim JH, Kim JH. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol.* 2004 dez 1; 173(11): 6973-80.
43. Xu Y, Wang W, Jin K, Zhu Q, Lin H, Xie M, *et al.* Perillyl alcohol protects human renal tubular epithelial cells from hypoxia/ reoxygenation injury via inhibition of ROS, endoplasmic reticulum stress and activation of PI3K/Akt/eNOS pathway. *Biomed Pharmacother.* 2017 set 5; 95: 662-9.
44. Yamaguchi T, Movila A, Kataoka S, Wisitrasameewong W, Torruella MR, Murakoshi M, *et al.* Proinflammatory M1 Macrophages Inhibit RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *Infect Immun.* 2016 out; 84(10): 2.802-12.
45. Yamaguchi Y, Kanzaki H, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, *et al.* Dimethyl fumarate inhibits osteoclasts via attenuation of reactive oxygen species signalling by augmented antioxidation. *J Cell Mol Med.* 2017 out 24; 20(10): 1-10.
46. Yuan X, Cao H, Wang J, Tang K, Li B, Zhao Y, *et al.* Immunomodulatory Effects of Calcium and Strontium Co-Doped Titanium Oxides on Osteogenesis. *Front Immunol.* 2017 set 29;8(1196): 1-15.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na primeira fase deste trabalho procurou-se determinar a maior concentração não citotóxica do POH sobre as células RAW264.7 para a seleção de concentrações adequadas a serem empregadas nos experimentos subsequentes. Dessa forma, foram realizados os testes de citotoxicidade e proliferação através do ensaio de azul de trypan e MTS. Os resultados demonstraram que o POH até a concentração de 100µM não produziu alterações na viabilidade celular e que não foi verificada atividade indutora do POH em nenhuma das concentrações testadas. Assim, utilizou-se 100µM de POH como a concentração máxima e também a concentração de 10µM para avaliar possíveis efeitos relacionados à dose.

Posteriormente foi avaliada a atividade imunomoduladora do POH com os experimentos de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e imunofenotipagem. A partir dessas análises foi possível observar que, na presença do LPS, o POH a 10µM tem efeito sinérgico ao LPS na indução de ROS e na concentração de 100µM este efeito é antagonista, ocorrendo uma redução da produção de ROS, comparado ao LPS isoladamente. Estes dados sugerem que, o POH, dependendo da concentração, pode apresentar atividade pro ou antioxidante.

Além disso, os resultados do PCR mostraram o papel do POH na polarização de macrófagos. Este efeito pode ser interessante no contexto da doença periodontal visto que foi demonstrado recentemente que a transferência adotiva de macrófagos M1 em camundongos previamente submetidos à indução da doença periodontal por ligadura promoveu uma redução da perda óssea alveolar nesses animais, sugerindo um papel protetor de M1 neste processo ⁽³⁴⁾. Neste contexto, a discreta polarização M1 e o significativo aumento dos níveis de ROS pelo POH a 10µM, aliado à inibição do fenótipo M2 evidenciadas *in vitro* em nosso estudo se mostram interessantes e incentivam maiores investigações sobre o papel imunomodulador do POH na periodontite experimental; isso porque, apesar dos estudos *in vitro* apresentarem vantagens por serem reprodutíveis, sensíveis, rápidos e permitirem limitar o número das variáveis experimentais, apresentam como limitação o fato de que em um organismo vivo ocorrem

inúmeros outros processos que podem interferir na ação da substância testada⁽²⁸⁾.

A partir desses resultados, pode-se concluir que o POH apresenta efeito imunomodulador sobre as células estudadas, sendo necessário avançar para outros estudos *in vitro*, como ensaio de fagocitose, estudos *in vivo* e posteriormente ensaios clínicos para expandir e confirmar os resultados expostos, além de permitir uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais o POH modula a resposta imune no contexto da doença periodontal.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se concluir que o POH:

- 1) Apresentou efeito antibacteriano moderado contra *F. nucleatum* e *P. gingivalis* na concentração de 250 µg/mL;
- 2) Até a concentração de 100µM não mostrou-se citotóxico sobre células da linhagem RAW 264.7;
- 3) Apresentou atividade inibitória sobre a proliferação de macrófagos a partir das 48 horas, a qual foi mais acentuada nas concentrações de 100µM e 250µM.
- 4) Exibiu atividade tanto pró como antioxidante, induzindo e inibindo a produção de ROS, dependendo da concentração;
- 5) Mostrou discreta atividade indutora do fenótipo M1 na concentração de 10µM e inibidora do fenótipo M2 na concentração de 100µM.

REFERÊNCIAS*

1. Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, Biguetti CC, Glowacki A, Yoshizawa S, *et al.* IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2015 mar; 30(3): 412-22.
2. Belanger JT. Perillyl alcohol: Applications in oncology. *Altern Med Rev.* 1998 dez; 3(6): 448-57.
3. Bicas JL, Fontanille P, Pastore GM, Larroche C. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *J Appl Microbiol.* 2008 dez; 105(6): 1991-2001.
4. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* 2006 abr; 440: 808-12.
5. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 mai; 423(6937): 337-342.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília. DF. 2006. [acesso 2017 jan 31]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf.
7. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages. *Front Immunol*, 2015 mai 26; 6: 1-15.
8. Chen TC, Fonseca CO, Schönthal A.H. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. *Am J of Cancer Res.* 2015; 5(5): 1580-93.
9. Choi HS, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem.* 2000 Set; 48(9): 4156-61.
10. D'alessio PA, Mirshahi M, Bisson JF, Béné MC. Skin Repair Properties of d-Limonene and Perillyl Alcohol in Murine Models. *Antinflamm AntiAllergy Agents Med Chem.* 2014 mar; 13(1): 29-35.
11. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000.* 2013 fev; 61(1): 16-53.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. 34
Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

12. Duetz WA, Bouwmeester H, van Beilen JB, Witholt B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *App Microbiol Biotechnol.* 2003 mai; 61(4): 269-77.
13. Erland LA, Bitcon CR, Lemke AD, Mahmoud SS. Antifungal Screening of Lavender Essential oils and Essential Oil Constituents on three Post-harvest Fungal Pathogens. *Nat Prod Commun.* 2016 abr; 11(4): 523-7.
14. Fonseca CO, Texeira RM, Silva JC, Fischer JSG, Meirelles OC, Landeiro JA, *et al.* Long-term outcome in patients with recurrent malignant glioma treated with perillyl alcohol inhalation. *Anticancer res.* 2013 dez; 33(12): 5625-31.
15. Gómez-Contreras PC, Hernández-Flores G, Ortiz-Lazareno PC, Toro-Arreola S, Delgado-Rizo V, Lerma-Díaz, *et al.* In vitro induction of apoptosis in U937 cells by perillyl alcohol with sensitization by pentoxifylline: increased BCL-2 and BAX protein expression. *Chemotherapy.* 2006 set 29; 52(6): 308-15.
16. Grabmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* 2005; 72: 505-35.
17. Guimarães MR, Coimbra LS, Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa Júnior C. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res,* 2011 abr; 46(2): 269-79.
18. Hassel TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000.* 1993 out; 3(1): 9-38.
19. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res.* 2015 mai 3; 2015: 1-10.
20. Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun.* 2014 out; 82(10): 4190-203.
21. Jayash SN, Hashim NM, Misran M, Baharuddin NA. In vitro evaluation of osteoprotegerin in chitosan for potential bone defect applications. *PeerJ.* 2016 ago 23; 1-19.
22. Kelloff GJ, Boone CW, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Doody LA, *et al.* New agents for cancer chemoprevention, *J Cell Biochem.* 1996; 26: 1-28.

23. Khan AQ, Nafees S, Sultana S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NFK-B activation and proinflammatory cytokine production. *Toxicology*. 2011 jan 11; 279: 108-14.
24. Kobayashi T, Yokoyama T, Ito S, Kobayashi D, Yamagata A, Okada M, *et al*. Periodontal and Serum Protein Profiles in Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Tumor Necrosis Factor Inhibitor Adalimumab. *J Periodontol*. 2014 nov; 85(11): 1480-8.
25. Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Brammar GC, Walsh KA, *et al*. Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol*. 2014 set; 193(5): 2349-62.
26. Medzhitov R. TLR-mediated innate immune recognition. *Semin Immunol*. 2007 fev; 19(1): 1-2.
27. Queiroz-Junior CM, Bessoni RL, Costa VV, Souza DG, Teixeira MM, Silva TA. Preventive and therapeutic anti-TNF- α therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. *Life Sci*. 2013 set; 93(9-11): 423-8.
28. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* 2003; 6(3): 317-320
29. Sakai DK. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun*. 1985 abr; 48(1): 146-52.
30. Shojaei S, Kiumarsi A, Moghadam AR, Alizadeh J, Marzban H, Ghavami S. Perillyl Alcohol (Monoterpene Alcohol), Limonene. *Enzymes*. 2014 dez; 36(7): 7-32.
31. Stayrook KR, McKinzie JH, Burke YA, Crowell PL. Induction of the apoptosis-promoting protein Bak by perillyl alcohol in pancreatic ductal adenocarcinoma relative to untransformed ductal epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1997 ago; 18(8): 1655-8.
32. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 fev; 15(1): 49-60.
33. Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. *Pharmacognosy*. 9^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.

34. Yamaguchi T, Movila A, Kataoka S, Wisitrasameewong W, Torruella MR, Murakoshi M, *et al.* Proinflammatory M1 Macrophages Inhibit RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *Infect Immun.* 2016 out; 84(10): 2.802-12.