



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2023

EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Lippia origanoides* Kunth NA PRODUÇÃO DE IL-13 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE

**Mariza Mascarenhas Cordeiro¹; Soraya Castro Trindade²; Isaac Suzart Gomes
Filho³; Antônio Pedro Fróes de Farias⁴; Yuri Andrade de Oliveira⁵; Angélica
Maria Lucchese⁶**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: mmascarenhas@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Saúde, UEFS, e-mail: soraya@uefs.com
3. Participante do Núcleo de Pesquisa, Prática Integrada e Intervenção Multidisciplinar (NUPPIIM), Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isuzart@gmail.com
4. Participante Externo do NUPPIIM, Pós-doutorando da Universidade Federal da Bahia, e-mail: froes1pedro@gmail.com
5. Participante do NUPPIIM, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UEFS, e-mail: yuriandrade.odont@gmail.com
6. Coordenadora do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON), Departamento de Ciências Exatas, UEFS, e-mail: soraya@uefs.com

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia origanoides* kunth; Il-13; periodontite

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de caráter inflamatória, crônica e multifatorial que atinge os tecidos de suporte dentário. Para o seu desenvolvimento, é necessária a existência de uma microbiota disbiótica, incluindo a presença de patógenos periodontais, a exemplo de *Porphyromonas gingivalis*, além da resposta imune do hospedeiro (HAJISHENGALLIS, 2014)

Os neutrófilos, quando ativados, recrutam linfócitos T CD4+, que sinalizam outras células imunes. O perfil Th2 é responsável pela produção de outras citocinas, como a IL-13, que induz a maturação e diferenciação dos linfócitos B e, conseqüentemente, a produção de anticorpos (PAN et al, 2019), regulando a imunidade humoral (ZHANG et al., 2018).

Para o tratamento desta doença, existem métodos mecânicos e químicos, associados ou não. No controle químico, utiliza-se algumas substâncias, como a clorexidina, o triclosan e antibióticos (ALMEIDA et al, 2014), que podem ter efeitos adversos (PERGORARO et al, 2014; CORTEZ, 2011; SEKIGUCHI et al, 2007).

Pesquisas estão sendo feitas com o objetivo de encontrar alternativas aos métodos químicos já existentes. Nesse sentido, as biomoléculas ativas presentes nos extratos vegetais vêm sendo estudadas (CORDEIRO et al, 2006), a exemplo dos extratos da *Lippia origanoides* Kunth, uma planta aromática comum no semiárido nordestino do Brasil (FLORA DO BRASIL 2020). Essa espécie possui ação antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, antipirética e antiespasmódica (Ministério da Saúde, 2018) e seus óleos essenciais extraídos tem potencial farmacológico que atuam na resposta inflamatória e nas mudanças relacionados a hemostasia (BRAGA et al, 2019).

Por isso, o objetivo deste estudo é investigar a existência de ação imunomodulatória do

extrato das folhas de *Lippia origanoides* Kunth sobre as células mononucleares produtoras de IL-13 do sangue periférico em indivíduos com periodontite.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), obedecendo a Resolução 466/12, sob número de parecer 1.344.223. Todos os participantes da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e receberam todas as informações pertinentes à pesquisa.

A avaliação periodontal foi realizada por examinador calibrado usando descritores clínicos periodontais, segundo a definição de Page, Eke (2007) e Eke (2012).

As folhas foram coletadas no Horto Florestal da UEFS e o extrato das folhas foi cedido pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON). A colheita de sangue periférico foi realizada por punção venosa em todos os participantes segundo protocolo modificado de Meyer e colaboradores (2005) e o cultivo de células do sangue periférico seguiu o protocolo padronizado por Trindade et al. (2008).

Cada extrato de planta foi colocado concomitantemente com o extrato bacteriano para estimulação no cultivo celular. Como controle negativo da cultura (CN), um poço permaneceu apenas com o sangue total. Já para o controle positivo utilizou-se o mitógeno Pokeweed (PWM).

As células foram cultivadas em estufa e as placas foram à centrífuga para obtenção do sobrenadante, que foi armazenado até o momento das análises. A produção da citocina IL-13 nos sobrenadantes da cultura de sangue total foi quantificada pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

Foi efetuada uma análise descritiva das características clínicas dos indivíduos. Para caracterização dos grupos de estudo, foram utilizados o teste de distribuição de Shapiro-Wilk, T de Student para a idade e Mann-Whitney para as demais variáveis, de acordo com a sua distribuição. As comparações entre os estímulos foram feitas a análise descritiva, o teste de Shapiro-Wilk, o teste de Friedman e o teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni para comparação entre os pares. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

58 indivíduos atenderam os critérios de elegibilidade e foram incluídos. 74,13% apresentavam periodontite, enquanto 25,86% não tinham o diagnóstico desta doença. No grupo com periodontite, a média de idade foi de 42,95 ($\pm 11,89$) anos e, no grupo sem periodontite, a média de idade foi de 30,87 ($\pm 9,27$) anos. Os grupos se mostraram heterogêneos com relação à variável idade ($p=0,001$).

Em relação aos parâmetros clínicos, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem periodontite, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das características clínicas entre os grupos de acordo com a classificação de Page, Eke (2007) e Eke (2012).

Descritor clínico	Grupo com Periodontite (N=43)	Grupo sem Periodontite (N=15)	P
Número de dentes (n)			
Mediana (IQ)	23,00 (19,50-26,25)	27,00 (23,75-28,00)	0,019 (Mann-Whitney)
Sangramento à sondagem			
Mediana (IQ)	36,50 (16,36-45,86)	7,47 (1,26-10,08)	0,003
Profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm			
Mediana (IQ)	4,74 (2,06-11,40)	0,00 (0,00-0,00)	0,000
Nível de inserção clínica maior ou igual a 3mm			
Mediana (IQ)	23,65 (9,98-61,45)	4,89 (1,59-9,14)	0,000

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na produção da citocina IL-13 pelas células do sangue periférico cultivadas sob quaisquer condições de cultivo (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre os grupos com e sem periodontite (Page, Eke, 2007; Eke, 2012) da concentração de IL-13 no sobrenadante da cultura das células do sangue periférico.

Estímulo	Grupo com Periodontite (N=43)	Grupo sem Periodontite (N=15)	P
Branco			
Mediana (IQ)	-4,87 (-10,02-2,22)	60,27 (-13,39-64,96)	0,31
PWM IL-13			
Mediana (IQ)	38,64 (12,23-182,54)	194,63 (9,96-325,82)	0,34
Extrato de <i>Porphyromonas gingivalis</i> e IL-13			
Mediana (IQ)	-1,70 (-7,65-20,22)	33,19 (-8,54-80,45)	0,38
Extrato de <i>Lippia organoides</i> Kunth			
Mediana (IQ)	0,09 (-10,72-5,74)	56,43 (-4,34-103,26)	0,11
Extrato de <i>P. gingivalis</i> + Extrato de <i>Lippia organoides</i> Kunth			
Mediana (IQ)	0,09 (-5,64-6,20)	51,12 (-2,79-113,68)	0,11

Neste estudo, não foi possível demonstrar uma alteração estatisticamente significativa na produção de IL-13 pelo extrato de *L. organoides* em relação ao extrato da bactéria *P. gingivalis*. Acredita-se que, se a resposta imunitária em resposta a esta infecção for dirigida para um perfil Th2, com a produção de IL-4 e IL-13, a destruição tecidual será menos intensa. Sendo assim, a IL-13 é considerada protetora à periodontite (CARVALHO-FILHO, 2016).

Salienta-se que houve limitação devido ao tamanho reduzido da amostra, o que impactou no poder da análise. Embora não tenha sido detectada diferença estatística, é possível

identificar graficamente e numericamente a maior produção de IL-13 pelas células que foram cultivadas com o extrato de *L. origanoides* e com os antígenos de *P. gingivalis* concomitantemente. Assim, é possível que, com o aumento na quantidade de participantes na pesquisa, possa ser demonstrada alguma atuação da planta na produção de IL-13.

Outro fator a ser considerado é que a método de extração alcoólica é muito eficaz para a obtenção dos compostos secundários da planta, cujo teor proteico é baixo. Isso impacta diretamente na resposta imunitária induzida por esse extrato, já que o sistema imunitário responde mais eficazmente a antígenos proteicos (LAMONT et al, 2018). Diante disto, sugere-se que outras formas de extração sejam testadas.

Sabe-se que o tratamento mecânico periodontal é beneficiado quando há um tratamento químico adjunto (GRAZIANI et al, 2017) e a ação antimicrobiana *Lippia origanoides* Kunth já foi demonstrada (ZAMORA et al, 2018). Uma possível atividade imunomoduladora adicional dessa planta ampliaria a capacidade desse agente adjuvante no controle da periodontite. Neste sentido, recomenda-se que novos estudos sejam realizados para uma melhor compreensão da interação da *Lippia origanoides* Kunth com os tecidos periodontais e a produção de citocinas.

CONCLUSÃO

O extrato de *Lippia origanoides* Kunth não teve potencial de induzir ou inibir a produção de IL-13 nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- HAJISHENGALLIS G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35(1):3-11.
- PAN W, WANG Q, CHEN Q. 2019. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci.* 11(3):30.
- ZHANG W, et al. IL-13 -1112 polymorphism and periodontitis susceptibility: A meta-analysis. 2018. *BMC Oral Health.* 18(1):1-9.
- ALMEIDA, R.M., et al. 2014. Uso de antimicrobianos sistêmicos e locais no tratamento da Periodontite Agressiva. *J Oral Sci.* 6(1):4-9.
- PERGORARO J, et al. 2014. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. *J Oral Invest.* 3(1): 33-37.
- CORTEZ, F.S. 2011. Avaliação ecotoxicológica do fármaco triclosan para invertebrados humanos. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Dissertação.
- SEKIGUCHI, R.T, et al. 2007. Alerta à resistência antibiótica em periodontia. *Rev Odontol UNESP.* 36(4):299-304.
- CORDEIRO C.H.G, et al. 2006. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42(3):395-404.
- Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Brasil. (2018) Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Lippia sidoides* Cham, Verbenaceae (Alecrim-pimenta) – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 72p
- BRAGA, M.A., et al. 2019. of Enzyme Modulators in Aqueous and Ethanolic Extracts of *Lippia sidoides* Leaves: Genotoxicity, Digestion, Inflammation, and Hemostasis. *Chem Biodivers.* 16(3).
- PAGE R.C., EKE P.I. 2007. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 78(7):1387-1399

- EKE, P.I. et al. 2012. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 83(12):1449-1454.
- MEYER R, et al. 2005. A produção in vitro de IFN-gama por células de sangue de cabra após estimulação com antígenos somática e pseudotuberculosis secretaram *Corynebacterium*. *Veterinária e Imunopatologia.* 107(3-4):249- 254.
- TRINDADE, S.C., et al. 2008. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *J Int Acad Periodontol*,10(2):50-8
- CARVALHO-FILHO, P.C., et al. 2016. Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in immunopathogenesis of chronic periodontitis. *Mediat Inflamm.*
- LAMONT R. J., KOO, H., HAJISHENGALLIS, G. 2018. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 16(12):745-759.
- GRAZIANI, F. et al. 2017. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology 2000.* 75(1):152-188.
- ZAMORA C. M. P., TORRES, C. A., NUÑEZ, M. B. 2018. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. *Molecules.* 23(3):1-23.