



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marianne Nicole Marques Nogueira

“Caracterização da ação modulatória de citocinas inflamatórias pelo óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes (terpinen-4-ol e alfa-terpineol) em macrófagos humanos ativados por lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*”

Araraquara

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marianne Nicole Marques Nogueira

“Caracterização da ação modulatória de citocinas inflamatórias pelo óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes (terpinen-4-ol e alfa-terpineol) em macrófagos humanos ativados por lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*”

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia – Área de concentração Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, para o título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Profa.Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Araraquara

2013

Nogueira, Marianne Nicole Marques

Caracterização da ação modulatória de citocinas inflamatórias do óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes (terpinen-4ol e alfa-terpineol) em macrófagos humanos ativados lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* / Marianne Nicole Marques Nogueira.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

102 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Óleo de melaleuca 2. Macrófagos 3. Citocinas 4. Inflamação
I. Título

Marianne Nicole Marques Nogueira

“Caracterização da ação modulatória de citocinas inflamatórias pelo óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes (terpinen-4-ol e alfa-terpineol) em macrófagos humanos ativados por lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*”

TESE PARA OBTENÇÃO DE GRAU DE DOUTORA

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e orientador: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

2ª Examinador: Profa. Dra. Flávia Sammartino Mariano Rodrigues

3ª Examinador: Profa. Dra. Juliana Rico Pires

4ª Examinador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

5ª Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara 28/03/2013

DADOS CURRICULARES

Marianne Nicole Marques Nogueira

NASCIMENTO *04/01/1975 Campina Grande-PB*

FILIAÇÃO *Francisco das Chagas Nogueira e Raimunda Marques F. Nogueira*

1993/1998 *Curso de Graduação em Odontologia*
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

1999/2000 *Curso de Especialização em Periodontia*
Academia Norte Rio Grandense de Odontologia
Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

2005/2007 *Mestrado em Odontologia – Área Periodontia*
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

2007/2009 *Professora e Coordenadora do Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia*
Centro de Estudos e Assistência Odontológica
CEAO, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil

2007/2009 *Professora e Coordenadora do Curso de Especialização em Periodontia*
Centro Odontológico de Estudos e Pesquisa (Universidade do Cruzeiro do Sul-PB) COESP, João Pessoa, Paraíba, Brasil

2009/2013 *Doutorado em Odontologia – Área Periodontia*
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brasil

DEDICATÓRIA

À Deus

“Porque Dele, por Ele, e para Ele são todas as coisas.”

Romanos 11.36

“Passa o homem como uma sombra em vão se inquieta amontoa tesouros e não sabe quem os levará. E eu, que espero? Senhor, Tu és a minha esperança.”

Salmos 39.6-7

AGRADECIMENTOS ESPECIAS

Aos meus pais Nogueira e Raimunda

Mais uma conquista, e vocês sempre ao meu lado, mesmo que distante dessa vez. São meu porto seguro e se cheguei até aqui foi pelo apoio incondicional de vocês. Muito obrigada por hoje e por sempre.

À Tony Carreon, meu companheiro

Nos escolhemos para dividir uma vida e cada conquista que conseguimos pertence aos dois. Este trabalho também é seu.

Aos meus irmãos Júnior, Rodolfo e Ilana

Vibro a cada conquista de vocês e tenho certeza que é recíproco. Muito obrigada por serem simplesmente meus irmãos.

À minha família

Que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Denise Spolidorio

Pelo apoio, paciência, amizade, confiança e principalmente pela oportunidade. Oportunidade que a senhora me ofereceu de ministrar aula, fazer pesquisa científica, escrever projetos e livros e a orientar trabalhos. Com a senhora aprendi a ser uma professora e pesquisadora, isto para a minha formação foi fundamental. Hoje sou outra pessoa e devo a senhora.

Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior

Minha profunda admiração a um professor exemplo, onde inteligência, competência, justiça e sinceridade andam juntas. Muito obrigada pela colaboração com o trabalho.

Ao Prof. Dr. Cleverton Roberto

Por nos ter apresentado o TTO, o que nos rendeu algumas pesquisas, pela atenção e disponibilidade, muito obrigada.

Aos professores curso de Pós Graduação em Odontologia – Área de Periodontia

Prof. Dr Joni Cirelli, Profa. Dra. Raquel Caminaga, Profa. Dra. Adriana Marcantonio, Prof. Dr Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra Silvana Orico, Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio e Profa. Dra. Daniela Zandim pelos ensinamentos e pela convivência durante o decorrer do curso.

A todos os colegas de pós-graduação

Pelo convívio que produziu boas lembranças que terei alegria em recordar.

Aos colegas que em especial contribuíram com o trabalho

Lígia, Marcell, Morgana, Sabrina Aquino e Sabrina Frasnelli muito obrigada pelo desprendimento de simplesmente ajudar por ajudar.

As queridas Amanda, Marília e Tete

Meninas em especial para vocês que guardarei sempre no meu coração.

As amigas do laboratório de Microbiologia

Aline Zenati, Carol, Ester Bordini, Juliana Pirola, Renatinha e Patrícia. Sentirei falta dos dias no laboratório com vocês.

À secretária da pós-graduação Mara Candida M. Amaral

Obrigada pelo carinho, disponibilidade e paciência.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Em especial aos funcionários da Portaria, do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia e do Departamento de Fisiologia e Patologia.

Sem o suporte de vocês seria inviável a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Na pessoa da Ilma. diretora Profa. Dra. Andréia Affonso B. Montandon

À CAPES, CNPq e FAPESP

Pelo apoio financeiro sem o qual não conseguiria realizar este trabalho.

Nogueira, MNM. Caracterização da ação modulatória de citocinas inflamatórias pelo óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes (terpinen-4ol e alfa-terpineol) em macrófagos humanos ativados lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli* [tese doutorado]. Arararquara: Faculdade de Odontologia da UNESP;2013.

RESUMO

O óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) tem propriedades antimicrobianas e somado a isso, sugere-se que apresente características anti-inflamatórias. Este estudo investigou o potencial do TTO e seus componentes (terpinen-4-ol e alfa-terpineol) em modular citocinas e os mecanismos intracelulares participantes desta ação. Células monocíticas (U937) foram diferenciados em macrófagos com 40ng/mL de 12-miristato 13-acetato de forbol. A citotoxicidade dos óleos foi determinada com o ensaio de redução de Metil-tetrazolium (MTT). A habilidade em modular a produção das citocinas após o estímulo com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (agonista de TLR2) e *Escherichia coli* (agonista de TLR4), foi estabelecida por meio de ensaios ELISA. Os efeitos dos compostos testados, na ativação de vias de sinalização intracelular, foram avaliados por western blot. As concentrações selecionadas pelo MTT foram: 0,015% e 0,004% para o TTO, 0,059% e 0,0073% para o terpinen-4-ol e 0,0064% e 0,0007% para alfa-terpineol. A influência do TTO na produção de citocinas foi mais marcante após estímulo de TLR4, com diminuição de IL-1 β , IL-6 e IL-10. O terpinen-4-ol reduziu a produção de INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 após ativação tanto TLR4 quanto TLR2. O alfa-terpienol atua após ativação de TLR2 e 4 inibindo a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Nenhuma das vias analisadas (NF-kB, ERK, p38 MAP-Kinase) sofreram interferência dos óleos. O TTO tem ação

modulatória inibindo produção de citocinas inflamatórias e o terpinen-4-ol é o seu maior componente ativo, entretanto este mecanismo não ocorre via inibição de NF- κ B, ERK e p38 MAP-Kinase.

Palavras-chave: Óleo de *Melaleuca*, macrófagos, citocinas, inflamação.

Nogueira, MNM. Characterization of modulatory action of inflammatory cytokines by *Melaleuca alternifolia* oil and its components (terpinen-4ol and alpha-terpineol) in human macrophages activated lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* [PhD thesis]. Arararquara: School of Dentistry, UNESP, 2013.

ABSTRACT

The oil of *Melaleuca alternifolia* (TTO) has antimicrobial properties, coupled with this, it is suggested that it also has antiinflammatory characteristics. This study investigated the potential of TTO and its components (terpinen-4-ol and alpha-terpineol) and cytokines in modulating the intracellular mechanisms that participate in this action. Monocytic cells (U937) were differentiated into macrophages with 40ng/mL 12-myristate 13-acetate phorbol. The oil cytotoxicity was determined with the reduction assay Methyl-tetrazolium (MTT). The ability to modulate cytokine production after stimulation with LPS of *Porphyromonasgingivalis* (TLR2 agonist) and *Escherichia coli* (TLR4 agonist), was established by ELISA assays. The effects of the tested compounds, the activation of intracellular signaling pathways were evaluated by western blot. The concentrations selected by the MTT were 0.015% and 0.004% for the TTO, 0.059% and 0.0073% to terpinen-4-ol and 0.0064% and 0.0007% for alpha-terpineol. The influence of TTO in cytokine production was more marked after TLR4 stimulation, with decreased IL-1 β , IL-6 and IL-10. The terpinen-4-ol reduced the production of INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 and IL-17 activation after both TLR4 as TLR2. The alpha-terpienol acts upon activation of TLR2 and four inhibiting the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10. None of the analyzed pathways (NF-kB, ERK, p38 MAP-Kinase) suffered interference oils. The TTO has modulatory action by

inhibiting the production of inflammatory cytokines and terpinen-4-ol is your greatest asset component however, this mechanism does not occur via inhibition of NF- κ B, ERK and p38 MAP-kinase.

Keywords: Tea Tree Oil, macrophages, cytokines, inflammation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
PROPOSIÇÃO	21
CAPÍTULO 1	22
CAPÍTULO 2	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO 1	87
ANEXO 2	92
ANEXO 3	96

INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais e compostos fitoquímicos vem ganhando força na medicina, sendo que uma grande porcentagem das novas moléculas descobertas, com vistas à sua introdução na indústria farmacêutica, provém de constituintes de plantas e/ou derivados semi-sintéticos. Estudos com produtos de origem natural apresentaram resultados entusiasmantes sobre os patógenos bucais, no controle da resposta inflamatória mostrando que, estes agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas^{1, 2, 20, 26, 54}.

A *Melaleuca alternifolia* é uma planta nativa da Austrália da família Myrtaceae. Conhecido como *tea tree oil* (TTO) a sua forma de uso é o óleo essencial que é obtido por destilação a vapor das folhas. O óleo de *Melaleuca alternifolia* é formado por uma mistura de aproximadamente 100 compostos, dentre eles os sesquiterpenos e monoterpenos, sendo este último predominante. Os principais monoterpenos são: o terpinen-4-ol, 1,8-cineol e o terpinoleno^{19, 22, 45, 68}.

Para ser designado como TTO o óleo deverá conter no mínimo 30% de terpinen-4-ol, podendo este valor chegar até 40% o que confere a característica de ser este o principal componente do TTO. Por se tratar de uma planta a composição do óleo pode variar de acordo com forma de extração e a região geográfica onde foi obtido, por isso a ISO 4730 determinou o padrão de concentração dos componentes conhecidos (Tabela 1)^{19, 22, 45, 68}.

Tabela 1- Principais componentes do óleo de *Melaleuca alternifolia* e as proporções. Carson et al., (2006)*.

Componente	Composição (%)	
	ISO 4730 ^a	Composição típica
Terpinen-4-ol	≥30 ^b	40,1
γ-Terpineno	10-28	23,0
α-Terpineno	5-13	10,4
1,8-Cineole	≤15 ^c	5,1
Terpinoleno	1,5-5	3,1
ρ-Cymene	0,5-12	2,9
α-Pinene	1-6	2,6
α-Terpineol	1,5-8	2,4
Aromadendrene	Mínimo-7	1,5
δ-Cadinene	Mínimo-8	1,3
Limoneno	0,5-4	1,0
Sabineno	Mínimo-3,5	0,2
Globulol	Mínimo-3	0,2
Viridiflorol	Mínimo-1,5	0,1

^a ISO 4730, Organização Internacional para Padronização.

^b Nenhum limite superior está definido, embora 48% sejam propostos.

^c Nenhum limite inferior está definido.

***Fonte:** Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1): 50-62.

O TTO tem capacidade de penetrar na pele, mas em pequena quantidade, cerca de 2% na sua forma pura e 4% em solução. Esta característica provavelmente é atribuída à maioria dos componentes do óleo que tem baixo poder de penetração. Entretanto, o terpinen-4-ol e o alfa-terpineol têm boa capacidade de adentrar nas membranas epidérmicas e também são um dos componentes solúveis mais estudados do TTO²³.

O TTO tem propriedades antibacteriana^{52, 80}, antifúngica^{20, 59, 73}, antiviral⁵⁶, anticancerosa³⁸ e anti-inflamatória⁴⁰. Devido a esta ampla atividade, o TTO se destaca para fins medicinais como no controle de infecções e inflamações na pele, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas e cremes vaginais. Em

Odontologia o seu uso ainda não é muito difundido e tal escassez pode ser devido a pouca informação sobre o TTO e sua ação nas doenças bucais. Entretanto, o TTO pode ser encontrado em dentifrícios e em soluções para bochecho^{19, 22}.

A base molecular dos efeitos anti-inflamatórios do TTO é pouco conhecida, mas acredita-se que se dá pela diminuição de citocinas inflamatórias e de superóxido. TTO age sobre linfócitos e monócitos interferindo na capacidade de secreção de citocinas isto é, enquanto decresce a produção de interleucina 2 (IL-2) aumenta a de interleucina 4 (IL-4) e de IL-10, citocinas pré e anti-inflamatórias respectivamente¹⁸. O TTO reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (importante no processo de digestão de microrganismos fagocitados) e a atividade de cicloxigenase (classicamente relacionada com inflamação). A capacidade do TTO em estimular quimiotaxia de leucócitos revelou ser ineficiente¹⁸. A atividade anti-inflamatória do TTO sobre inibição da adesão dos neutrófilos é fraca nas concentrações de 0,016% a 0,033%¹. Visto que para os neutrófilos não há ação do TTO, sugere-se que o mecanismo de ação do óleo seja seletivo regulando a função dos monócitos durante a inflamação¹.

O componente mais abundante do TTO, o terpinen-4-ol é capaz de reprimir em 40 a 50% da produção de citocinas como interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-10 (IL-10) e prostaglandina E₂ (PGE₂), quando monócitos do sangue periférico de humano são estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) de *E. coli*⁴⁰.

Já o mecanismo de ação do alfa-terpineol não interfere na produção de citocinas, apesar de suprimir a produção de superóxido¹¹.

Em estudo realizado com humanos o terpinen-4-ol e alfa-terpineol foram aplicados na pele de voluntários 20 minutos antes da injeção intradérmica de

histamina. A pápula formada foi medida com paquímetro a cada 10 minutos durante 60 minutos. O mesmo experimento foi repetido em ratos Sprague-Dawley e os achados dos experimentos foram semelhantes para humanos e ratos. O terpinen-4-ol demonstrou efeito inibitório da resposta inflamatória, principalmente por diminuir a vasodilatação e o extravasamento de plasma. Para o alfa-terpineol foram encontradas propriedades anestésicas⁴⁷.

No âmbito da odontologia, estudos que analisaram os efeitos do TTO obtiveram resultados interessantes com ação deste sobre o biofilme dentário e na redução do índice gengival e índice de sangramento papilar⁷⁰. A periodontite crônica é uma doença multifatorial que resulta na diminuição ou alteração dos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentários e sua patogênese envolve fatores microbianos, resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro. Ainda, estes fatores podem ser modulados por condições locais, ambientais e genéticas^{37, 48}. Apesar de existirem estudos que sustentem a hipótese de que o TTO possui ação anti-inflamatória por meio da redução de citocinas e de espécies reativas do oxigênio, seu mecanismo de ação ainda não está bem compreendido⁴⁰.

Na periodontite crônica, assim como em outros processos patológicos inflamatórios crônicos, as células do hospedeiro irão detectar a presença dos periodontopatógenos e reagir às novas condições, na tentativa de eliminar o agente causal. Por outro lado, as bactérias patogênicas poderão evadir-se da resposta inflamatória/imunológica do hospedeiro com o objetivo de sobreviver no micro ambiente por meio de inibição ou ativação de vias de sinalização da célula eucarionte²⁸.

De fato, a primeira linha de defesa do organismo frente à invasão microbiana consiste de uma resposta inata que depende, muitas vezes, da ativação de

receptores presentes na superfície das células epiteliais, os chamados receptor de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors* - PRR). Tais receptores reconhecem principalmente LPS, lipoproteínas e ácidos lipoteicóicos, chamados de padrão molecular associados aos patógenos ou microrganismos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMP)^{4, 31}.

Os receptores Toll-like (TLR) são um tipo de PRR, proteínas de superfície e intracelular expressas em células do sistema de defesa inato e adaptativo que foram numerados em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11^{4, 31}. Os TLR4 são expressos em uma grande variedade de células, mais predominantemente células do sistema imunológico como os macrófagos.

Estudos *in vitro* têm demonstrado expressão de TLR1, TLR2 e TLR6 em variados tipos celulares como as células epiteliais gengivais primárias. Embora apenas TLR2 e TLR4 tenham sido relatados em tecido gengival, na saliva e no plasma de pacientes com doença periodontal, tal diferença na expressão de TLR2 e TLR4 sugere que suas quantificações possam ser utilizadas no diagnóstico das doenças periodontais^{5, 14}.

De fato, são identificadas correlações positivas, quando parâmetros clínicos como índice de placa, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem são cruzados com a expressividade de TLR2 e TLR4⁸³.

A ativação dos TLRs através da interação receptor ligante é um evento crítico no desencadeamento da resposta imune que, resulta na tentativa de eliminação do patógeno pelas células do sistema imunológico, as quais liberam de uma série de citocinas, peptídeos antimicrobianos e quimiocinas²⁸.

P. gingivalis está intimamente envolvido na etiologia da periodontite. O LPS presente em sua membrana tem demonstrado grande capacidade de estimular

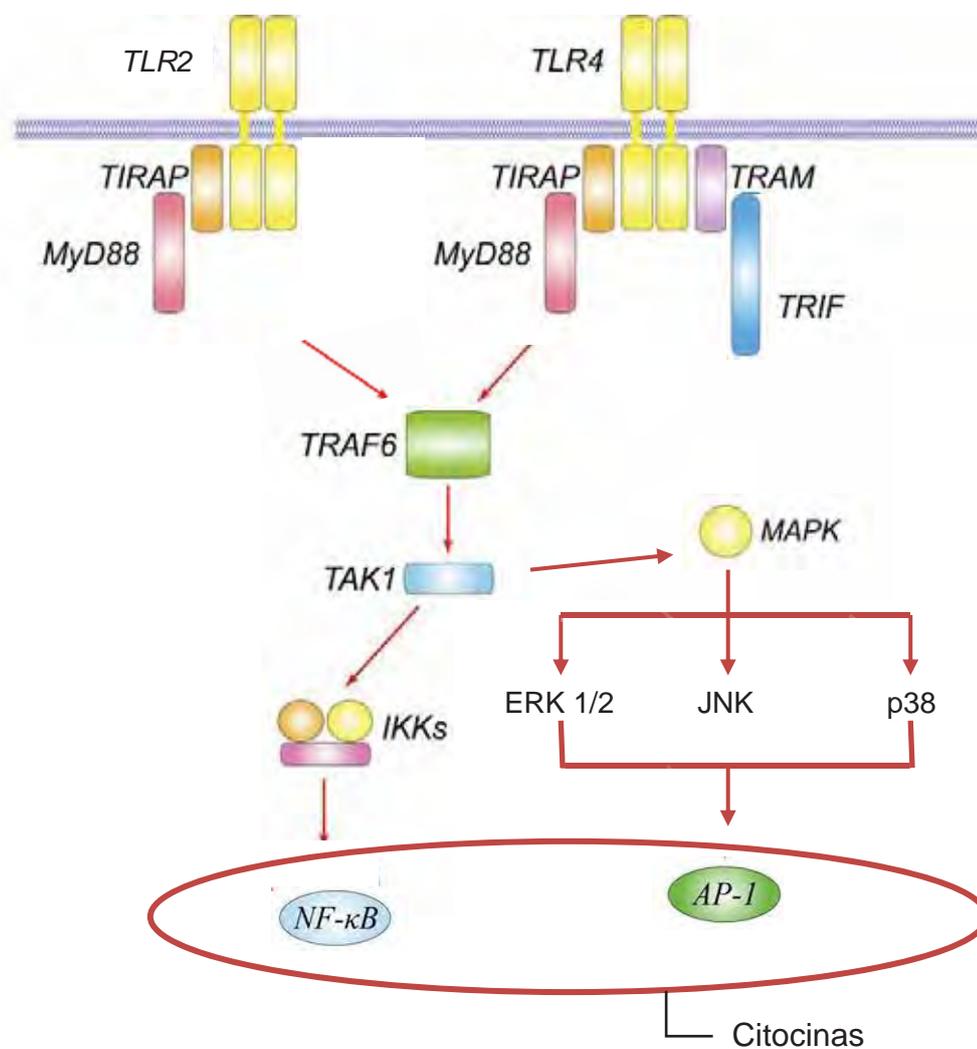
células do sistema inato como os monócitos, propiciando a sua quimiotaxia para os sítios de infecção, com aumento da diferenciação em macrófagos^{7,9}.

Este tipo de LPS interage com receptores TLR2 e TLR4⁴⁴. Após a ativação de TLR2 ocorrerá a ligação a duas proteínas adaptadoras: o fator 88 de diferenciação mielóide (*Myeloid differentiation factor 88 -MyD88*) e o domínio TIR contendo a proteína adaptadora/MyD88 (*TIR-domain containing adapter protein/Myd88 adapter-like - TIRAP/MAL*). No caso de TLR4 o processo de ativação envolve quatro proteínas, sendo duas semelhantes a do TLR2, um adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon-beta (*TIR-domain containing adapter inducing INF- β - TRIF*) e uma molécula adaptadora relacionada ao TRIF (*TRIF-related adapter molecule - TRAM*) (Figura 1)^{44, 69, 74}.

A via de MyD88, uma vez ativada, recruta o fator 6 associado ao receptor de TNF citoplasmático (*TNF receptor associated factor 6 - TRAF6*) e subsequentemente ativa o fator transformador de crescimento, cinase ativada por TGF- β (*TGF- β -activated protein kinase 1 - TAK1*) do I kappa beta quinase (*inhibitor of NF-kB kinase - IKK*). Classicamente, o fator de transcrição nuclear kB (*Nuclear factor kappa B- NF-kB*) é mantido latente no citosol ligada a IKK α . A ativação de TLRs induz a degradação de IKK α e de parte da proteína NF-kB (ubiquinização) pelo proteossomo 26S. Como consequência, NF-kB ativado é então translocado para o núcleo e se liga ao elemento responsivo ao NF-kB no DNA, regulando os promotores de várias citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e PGE₂. O NF-kB ativado presente no núcleo será inativado por IKK β . No núcleo, o aumento da expressão do gene produtor de IKK β e, conseqüentemente, sua proteína, inativa a ação de NF-kB no DNA (Figura 1)^{69, 74}.

Também é importante descrever que a ativação de TAK1, que ocorre após o estímulo de TLRs, também é capaz de ativar MAP-Kinases que regulam o fator de transcrição AP-1 através de TRAF6/Tak, e com isso desencadeiam a síntese de citocinas inflamatórias (Figura 1)^{69, 74}.

Figura 1- O receptor TLR4 e a via MyD88 dependente. MyD88 ativa TRAF6, bem como os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. Estes fatores de transcrição induzem expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. Figura adaptada de Lu, Yeh, Ohashi., (2008)*.



*Fonte: Lu YC, Yeh WC, Ohashi OS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008; 42(2): 145-151.

Durante a doença periodontal ocorre a ativação de células como monócitos e linfócitos com produção de diferentes citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-17, as quais estão relacionadas com o processo destrutivo dos tecidos periodontais. Um indicativo de atividade de doença está no aumento destas citocinas no fluido gengival^{37, 48, 71}.

Adicionalmente, nesses eventos inflamatórios outras células também são ativadas como macrófagos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, que irão produzir citocinas que medeiam a resposta imune e inflamatória e entre elas estão a IL-10^{25, 30, 60, 67}.

Sendo assim, a regulação da produção de algumas citocinas poderia reduzir a reação inflamatória e como consequência modular negativamente a progressão da doença periodontal^{24, 34, 58}. Entretanto, métodos de modulação da resposta do hospedeiro por inibição da produção de citocinas por longos períodos e que não causem danos sistêmicos aos humanos, proporcionando segurança e eficácia, ainda precisam ser encontrados³⁴.

Desse modo, para ser efetivo, o tratamento periodontal deve estar centrado na redução microbiana e no controle da resposta imunológica e/ou inflamatória do hospedeiro, visando modular o binômio formação/destruição dos tecidos de sustentação do órgão dentário, permitindo a estagnação da destruição dos tecidos periodontais^{35, 37}.

Classicamente, a terapia de redução bacteriana por controle mecânico do biofilme dentário tem demonstrado eficácia e ainda é mais indicada na prática clínica. Contudo existem casos em que esta abordagem não é suficiente, exigindo complementações à terapia tradicional, e é nesse momento que a terapia do controle químico do biofilme dentário, assim como a modulação da resposta do

hospedeiro podem ser adotadas. A terapia de modulação da resposta do hospedeiro tem como proposição diminuir a reação inflamatória crônica, suas citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, suprimir a destruição dos tecidos periodontais^{35, 37}.

O TTO tem demonstrado capacidade de supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias associada ao aumento nas citocinas anti-inflamatórias. Desse modo, este trabalho tem como objetivo analisar, *in vitro*, a capacidade modulatória do TTO e alguns de seus componentes sobre citocinas inflamatórias e estudar os mecanismos desta atividade. Para tanto, foram realizados estudos que avaliaram a capacidade de modulação de citocinas e que quantificaram a expressão dos genes envolvidos nas vias de sinalização desse processo, bem como a produção de suas citocinas, por meio do estímulo de macrófagos humanos por LPS de *P. gingivalis* e de *E. coli*.

PROPOSIÇÃO

Com base nas informações apresentadas temos as seguintes hipóteses:

- 1 O óleo de *Melaleuca alternifolia* exerce efeito modulador na produção de citocinas por macrófagos após estímulo de TLR.
- 2 A atividade modulatória dos óleos sobre as citocinas se dá pela regulação do NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinases.
- 3 O efeito modulador do óleo de *Melaleuca alternifolia* estaria relacionado a um de seus componentes principais.

Levando em consideração as hipóteses descritas este trabalho tem como proposição:

- 1 Analisar o efeito do TTO e de seus componentes terpinen-4-ol e alfa-terpineol na expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e anti-inflamatórias como IL-10, em cultura celular tipo macrófagos derivados de monócitos, estimuladas por LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* (capítulo 1).
- 2 Verificar o efeito do TTO e de seus componentes terpinen-4-ol e alfa-terpineol sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , IL-12, IL-17 e anti-inflamatórias como IL-4 em cultura celular tipo macrófagos derivados de monócitos. A ativação das células foi feita utilizando LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* (capítulo 2).
- 3 Verificar se a modulação de citocinas anti-inflamatórias dos óleos se dá por inibição das via de sinalização NF-kB, ERK ou p38 MAP-Kinase (capítulos 1 e 2).

CAPÍTULO 1

“*Melaleuca alternifolia* e seus componentes, terpinen-4-ol e alfa-terpineol inibem a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 em macrófagos derivados de monócitos (U937) ativados por LPS de *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*”

* Artigo seguiu as normas do periódico Infection and Immunity.

RESUMO

A atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) está bem estabelecida, entretanto, os mecanismos de modulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias ainda não estão claros. No presente estudo foram investigadas, in vitro, a capacidade do TTO e seus componentes (terpinen-4-ol e alfa-terpineol) na modulação do fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), citocinas envolvidas na resposta imune. Também foram investigadas possíveis vias de sinalização em que esta modulação de citocinas poderia atuar. Monócitos U937 foram diferenciados em macrófagos com PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) e estimulados com Lipopolisacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*. Para determinar a interferência na produção de citocinas foi utilizado o teste ELISA. A investigação das vias de sinalização foi por western blot, utilizando anticorpos para Nuclear Factor kappa B (NF- κ B), Extracellular signal-regulated kinases (ERK) e p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAP-Kinase). O TTO e seus componentes não tiveram ação sobre a produção de TNF- α entretanto, todos foram efetivos em diminuir a quantidade de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Todavia nenhuma das vias investigadas influenciou neste resultado. Dessa forma, podemos concluir que o TTO, o terpinen-4-ol e o alfa-terpineol podem suprimir a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos humanos ativados, contudo a inibição não ocorre via NF- κ B, ERK ou p38 MAP-Kinase.

Palavras-chave: Óleo de *Melaleuca*, macrófagos, citocinas, inflamação

INTRODUÇÃO

Melaleuca alternifolia é uma planta nativa da Austrália, a destilação a vapor das folhas, produz um óleo conhecido por *tea tree oil* (TTO). O TTO é formado por uma mistura de aproximadamente 100 compostos, dentre eles os sesquiterpenos e monoterpenos, sendo este último predominante. Os principais monoterpenos são: o terpinen-4-ol, 1,8-cineol e o terpinoleno (1, 2, 3, 4).

O óleo de *Melaleuca alternifolia* tem propriedades antimicrobianas (5, 6, 7, 8), anticancerosa (9) e anti-inflamatória (10). O mecanismo de ação anti-inflamatório se dá pela supressão da produção de superóxido e de mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , interleucina-8 (IL-8) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em monócitos humanos. Também se dá pela redução em até 50% da produção de IL-8 em células epiteliais orais, além de diminuir a formação de edema durante a inflamação em experimento em humano (10, 11, 12, 13).

Devido ao amplo espectro de atuação, o TTO vem sendo utilizado na medicina para o controle de infecções e inflamações na pele, queimaduras, picadas de inseto, gel para espinhas, cremes vaginais e para a pele (1, 2).

No processo inflamatório, a resposta imune inata envolve o reconhecimento de componentes microbianos (LPS, lipoproteínas e ácidos lipotecóicos) por receptores presentes na membrana das células. Os Receptores Toll-like (TLR) reconhecem estes patógenos. Após a ativação dos TLR, uma cascata de sinalizações celulares são estimuladas levando a ativação de fatores de transcrição, com conseqüente produção de citocinas inflamatórias (14, 15, 16).

O aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias está relacionado a patogênese da doença periodontal, responsável por uma das principais causas da perda dentária. Esta resposta inflamatória pode ser deletéria aos tecidos de proteção

e sustentação do dente, é descrita como desencadeada, fundamentalmente, por microrganismos patogênicos que podem estimular uma resposta imune destrutiva (17, 18, 19).

Os TLR2 e TLR4 estão envolvidos no reconhecimento de periodontopatógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (16, 20). Pacientes com periodontite crônica apresentam maior expressão de TLR2 e TLR4 na saliva e no plasma e estes receptores têm sido indicados como uma possibilidade no diagnóstico das doenças periodontais (21).

A ativação dos TLRs através da interação receptor ligante desencadeia uma série de eventos na tentativa de eliminar o patógeno por meio da liberação de uma série de citocinas, peptídeos, antimicrobianos e quimiocinas (22). Especificamente em relação às citocinas, a ativação da via de NF- κ B demonstra grande importância (19).

Portanto, estratégias que visem inibir a ativação do NF- κ B tem potencial para mediar o processo de desenvolvimento da doença periodontal, sendo assim, o bloqueio dos dímeros do fator de transcrição, bloqueio da degradação do I kappa alfa quinase (*inhibitor of NF- κ B kinase - IKK α*) ou a inibição do IKK, podem ser uma opção de terapêutica importante. Principalmente quando associadas aos procedimentos terapêuticos consagrados como a raspagem e alisamento radicular e o controle periódico do biofilme dentário. Notadamente nos casos em que a terapêutica convencional não for efetiva (19, 22).

O TTO tem demonstrado capacidade de supressão da produção de citocinas inflamatórias, indicando ser uma boa opção no tratamento periodontal via modulação da resposta do hospedeiro. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar, in

vitro, a capacidade do TTO e alguns de seus componentes em modular a produção de citocinas inflamatórias e estudar os mecanismos desta atividade. Para tanto, avaliamos a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 e anti-inflamatória, IL-10, assim como as vias de sinalização envolvidas nesse processo.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Óleo de *Melaleuca* e seus componentes

A composição do óleo *Melaleuca alternifolia* (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) pode variar de acordo com a forma de extração e a região geográfica onde foi obtido. A cromatografia gasosa do óleo constatou que o TTO estava dentro das especificações da ISO 4730 e o cálculo das concentrações relativas dos componentes demonstrou que o terpinen-4-ol foi 47,66% e o alfa-terpineol 5,13%. Os componentes terpinen-4-ol e alfa-terpineol foram obtidos individualmente (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA).

2 Cultura de monócitos e diferenciação em células aderentes tipo macrófagos

Os monócitos U937 foram adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CRRJ: CR016), mantidos em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO - Life Technologies) com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO - Life Technologies) e 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO - Life Technologies), em atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram semeadas na concentração de 25 x 10⁴ céls/mL em garrafas de cultivo celular de 182cm², com meio trocado três vezes por semana.

Para induzir a diferenciação dos monócitos em células aderentes tipo macrófagos foi utilizado PMA (12-miristato 13-acetato de forbol (Phorbol 12-

myristate 13-acetate-Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) (24). Células com viabilidade acima de 92% (Azul de Tripán 0,4% - GIBCO - Life Technologies) foram utilizadas para diferenciação. Os monócitos ($1,0 \times 10^6$ céls/mL) foram semeados em placas e incubados por 24h com 40ng/mL de PMA. Em seguida o meio foi aspirado e os poços lavados duas vezes com PBS, para remoção do PMA. Um novo meio foi adicionado (RPMI) com 10% de soro fetal bovino e mantidos por mais 24h e somente então os experimentos foram iniciados.

3 Concentrações e tipos de lipopolissacarídeos utilizados

Para estimular a resposta inflamatória nas células, foram utilizados LPS de *P. gingivalis* 1µg/mL (Invivogen – San Diego, CA, USA) uma vez que este microrganismo está intimamente relacionado com a etiologia da doença periodontal. Em virtude da interação do LPS de *P. gingivalis* com os receptores Toll Like Receptor 2 (TLR2) e Toll Like Receptor 4 (TLR4) também utilizamos LPS de *Escherichia coli* (1µg/mL / Invivogen – San Diego, CA, USA), considerado como ativador específico de TLR4. Assim teríamos um estímulo exclusivo de TLR4 (LPS de *E. coli*) e outro de TLR2/TLR4, mais potente para TLR2 (LPS de *P. gingivalis*) (25).

4 Toxicidade do óleo de *Melaleuca* e seus componentes (Ensaio do MTT).

Os monócitos foram diferenciados em macrófagos (protocolo já descrito - item 2) em placas de microtitulação de 24 poços. Foi preparada uma solução estoque de cada óleo (TTO 0,25%; terpinen-4-ol 0,238% e alfa-terpineol 0,0064% (vol:vol), com RPMI-1640, com 1% de soro fetal bovino inativado sem penicilina- estreptomicina.

Em todos os óleos foram acrescentados 0,4% Dimethyl sulfoxide – DMSO (Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) como agente solubilizante (11).

Esta solução estoque foi diluída nas concentrações finais utilizadas nos poços contendo as células. As concentrações finais foram: TTO 0,125%, 0,062%, 0,031%, 0,015%, 0,008% e 0,004%, terpinen-4-ol 0,119%, 0,059%, 0,029%, 0,014% e 0,0073% e alfa-terpineol 0,0031%, 0,015% e 0,0007% valores obtidos pela cromatografia. As células foram então cultivadas neste meio de cultura contendo as diferentes concentrações de óleo por 24h.

Após o período de 24h, cada poço foi lavado com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e adicionado RPMI-1640 sem soro fetal bovino acrescido de 0,5mg/mL do sal de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide - Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA), sendo posteriormente incubadas por 4h a 37°C. A seguir a solução de MTT foi substituída por 300µL de isopropanol acidificado (HCl 5mM) para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi registrada por espectrofotômetro para placas (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader Hercules, Califórnia, EUA) com comprimento de onda 550 nm.

5 Efeito do TTO, terpinen-4-ol na produção de citocinas por macrófago estimulados por LPS.

Os monócitos foram diferenciados em macrófagos nas mesmas condições descritas anteriormente e semeados em placas de microtitulação de 12 poços. Finalizado o protocolo de diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS e o meio substituído por outro contendo a maior e menor concentração não citotóxica do óleo e de seus componentes, determinadas previamente no teste do MTT. O preparo das soluções seguiu o mesmo protocolo adotado no teste de

MTT. Após a adição dos óleos aguardou-se 2h (26) e somente depois as células foram estimuladas com os LPSs por 24h (37°C, 5% CO₂), segundo os seguintes grupos experimentais (Figura 1).

- a. Célula sem estímulo (controle negativo);
- b. Células com DMSO 0,4% (controle negativo-veículo);
- c. Mesmo volume dos óleos sem LPS (controle negativo-tratamento);
- d. LPS de *P. gingivalis* (controle positivo-estímulo);
- e. LPS de *E. coli* (controle positivo-estímulo);
- f. Óleos com LPSs (grupos experimentais - tratamento)

Este estudo buscou avaliar se o TTO e seus dois componentes teriam ação na inibição da produção de citocinas inflamatórias.

Um segundo grupo experimental foi elaborado com inibidores de três vias de sinalização celular: NF-κB, ERK1/2 e p38 MAP-Kinases (respectivamente: Bay11-7082 (10 μM); PD98059 (10 μM); SB203580 (10 μM) - Invivogen - San Diego, CA USA). Todos os inibidores foram adicionados previamente (40 minutos) ao estímulo com o LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*. Como controle positivo foram utilizados os LPS de *P. gingivalis* 1μg/mL e *E. coli* (1μg/mL), e como controle negativo as células sem nenhum estímulo. Em todos os casos o estímulo com LPS foi mantido por 24h (Figura 1).

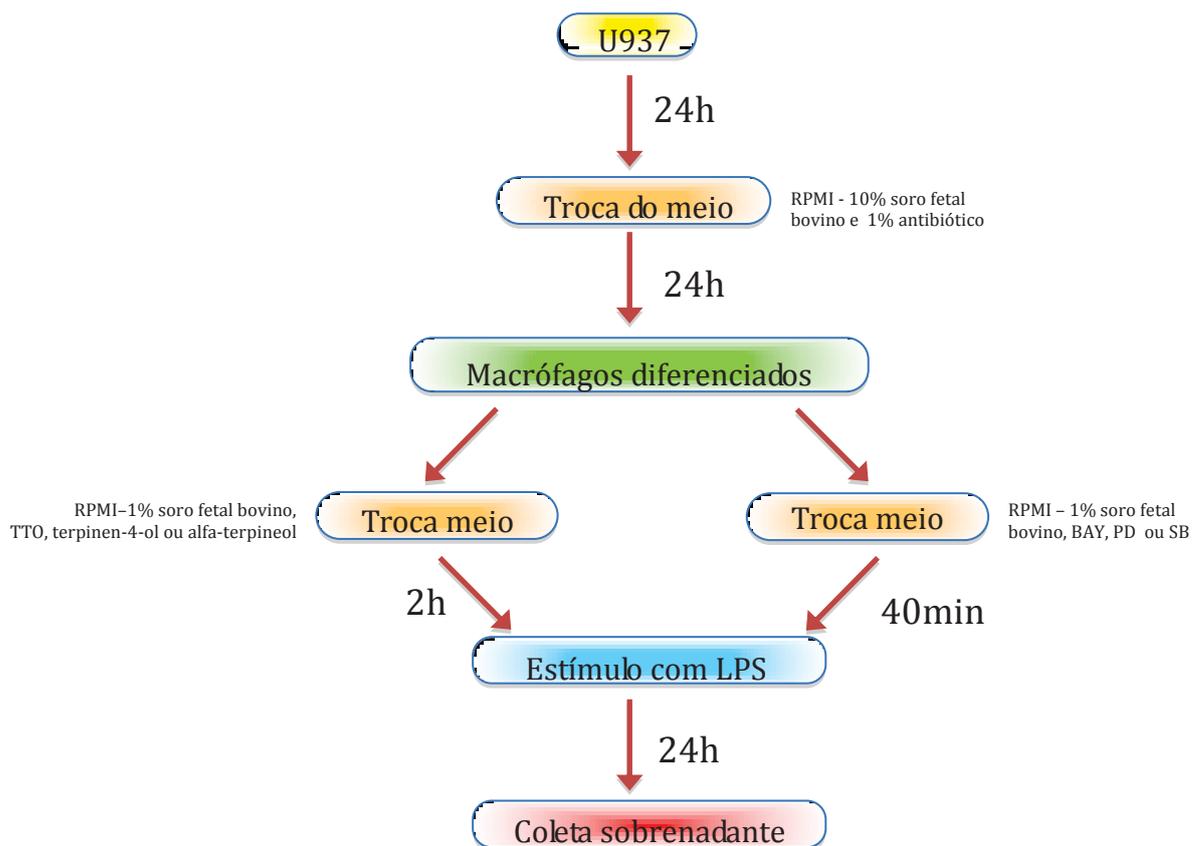


Figura 1. Fluxograma dos estímulos, grupos e momentos do estímulo do experimento.

Este segundo experimento visou identificar, de uma forma comparativa com os inibidores, como o óleo e seus componentes atuam sobre a produção de citocinas; uma vez que o óleo e seus componentes poderiam modular a atividade de mais de uma via de sinalização. Assim, selecionamos inibidores bioquímicos específicos (BAY, PD e SB) das vias de sinalização mais importantes para a expressão de genes relacionados com a inflamação. E também das vias de sinalização usualmente moduladas por TLR2 e TLR4, para determinar, de forma específica, a influência/contribuição de cada uma delas na regulação da expressão de citocinas quando na presença dos óleos (27, 28, 29).

Os experimentos foram realizados em réplicas e repetidos em dois momentos diferentes. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 13.000 rpm a 4°C, aliquotado e armazenado a -80°C.

Para normalização dos resultados do ELISA, foi obtida a concentração de proteína total nas amostras pelo método de Bradford (30). Para obter o maior rendimento das amostras coletadas, inicialmente realizamos um experimento piloto para ajuste da diluição das amostras utilizando ELISA multiplex. Com as diluições acertadas procedeu-se o ELISA multiplex das amostras.

O sobrenadante foi analisado pelo Bio-Plex Cytokine Assay de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Resumidamente, as amostras foram incubadas com as “beads” em temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas, incubadas com anticorpo biotilado anti-citocina por mais 30 minutos e depois 10 minutos com estreptavidina-ficoeritrina. As concentrações de citocinas foram medidas utilizando o equipamento Luminex 96 poços leitor de placas (Bio-100-Plex™ Multiplex-Suspension-Array Reader; Bio-Rad Laboratories, Munique, Alemanha) e o Gestor de Bio-Plex™ Software 4.1.1. Citocinas humanas recombinantes foram utilizadas como padrões.

6 Avaliação das vias de sinalização (Western Blot).

Macrófagos ($1,0 \times 10^6$ cel/mL, 37°C, 5% CO₂) em placas de 60cm² foram tratados por 2h com TTO 0,015%, terpinen-4-ol 0,059% e alfa-terpineol 0,0064% em RPMI 1640 contendo 1% de soro fetal bovino, sem penicilina- estreptomicina com DMSO 0,4% (controle-veículo). Após as 2h um grupo dos óleos não recebeu estímulo e outros foram estimulados com LPS de *P. gingivalis* ou LPS de *E. coli* mantidos por 10 minutos para avaliação da ativação das vias de sinalização de

interesse. Os grupos controle negativo e positivo foram os macrófagos sem estímulo e com cada um dos dois LPSs, respectivamente.

Ao final do período experimental o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS à 4°C e adicionado o tampão de lise (80 µL) suplementado por coquetel inibidor de protease e fosfatase (Complete Mini EDTA-free - e PhoStop - Roche Applied Science, Mannheim, Germany; e M-Per - Thermo Scientific Rockford, IL USA). As células foram raspadas e o lisado celular transferido para microtubos e mantidos em gelo por 15 a 30 minutos para lise completa das células, seguido de centrifugação a 12.000 rpm e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas nucleares e citoplasmáticas solubilizadas foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C.

As proteínas foram quantificadas (20µg) pelo método de Bradford (30) e após desnaturação por calor e adição do tampão de amostra contendo 0,1 M de ditioneitol (DTT) como agente redutor e desnaturante, um total de 20µg de proteínas foi submetido à eletroforese (SDS-PAGE) em géis de poliacrilamida descontínuos (10% Mini-Protean TGX - Bio-Rad Laboratories, Munique, Alemanha), com voltagem constante de 100V por 90 minutos, seguidos de eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (poros de 0.2µm) durante 1h a 300mA constantes em tampão de transferência contendo metanol.

Para bloqueio das membranas, foi utilizado Tris-NaCl (TBS) contendo 5% de leite desnatado liofilizado por 1h sob agitação, depois 3 lavagens de 5 minutos com tampão TBS-Tween a 0,1%. As membranas foram incubadas por 16-18 h (overnight) a 4°C e sob agitação suave com anticorpos primários monoclonais obtidos comercialmente reativos com formas fosforiladas de p65, indicativo da ativação de NF-kB (Phospho-NF-kB p65 - Cell Signaling, 65kDa), formas fosforiladas de p44-42,

indicativo da ativação de ERK1/2 MAP-Kinase (Phosfo-p44/42 MAP-Kinase - Cell Signaling, 42kDa) e p38 MAP-Kinase (Cell Signaling, 43kDa), além da avaliação da expressão de GAPDH (Cell Signaling, 37kDa) como normalizador do carregamento da mesma quantidade de proteína total em todas as amostras.

O anticorpo primário foi removido e as membranas lavadas 3 vezes com TBS-T (15 min/lavagem). O anticorpo secundário espécie-específico conjugado à enzima horseradish peroxidase (HRP) foi diluído em tampão de bloqueio segundo orientação do fornecedor e incubado por 1h sob agitação (temperatura ambiente). As membranas foram lavadas em TBS-T novamente (3x, 15 min/lavagem) e a detecção da presença de proteínas realizada por um sistema de quimioluminescência (West Pico Supersignal, Pierce Biotechnology).

ANÁLISE DOS DADOS

Antes da análise, foi testada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e para significância foi designado o valor de $p < 0,05$. Na avaliação da citotoxicidade foi realizado o percentual tomando como 100% o controle negativo, para comparação entre os grupos foi utilizado o ANOVA com pós teste de Tukey. Na avaliação na produção citocinas foi utilizado o Teste-t onde se comparou o controle positivo, no caso os LPS de *E. coli* e *P. gingivalis*, com cada grupo dos óleos e dos inibidores. Os programas utilizados para a obtenção dos gráficos e análise estatística foi o GraphPad Prim 5.

RESULTADOS

1 Toxicidade do óleo de *Melaleuca* e seus componentes.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e cada concentração do óleo e seus componentes foi repetida 6 vezes por experimento ($n = 6$). Como grupo controle negativo foi considerada a linhagem celular de U937 diferenciada em macrófagos e DMSO 0,4%. Para chegar aos valores percentuais foi considerado como 100% os valores para o controle negativo sem estímulo. A concentração não citotóxica foi arbitrariamente considerada como aquela em que pelo menos 50% de células estavam viáveis (em comparação ao controle negativo).

A Figura 2 ilustra a viabilidade celular das diferentes concentrações do TTO. Pode-se observar que o TTO a 0,25%, 0,125%, 0,062% e 0,031% foi citotóxico para os macrófagos. Contudo, a partir do valor de 0,015% não houve citotoxicidade para as células e optou-se usar a maior e menor concentração, respectivamente 0,015% e 0,004%. O DMSO a 0,4% (solvente) não interferiu na viabilidade celular.

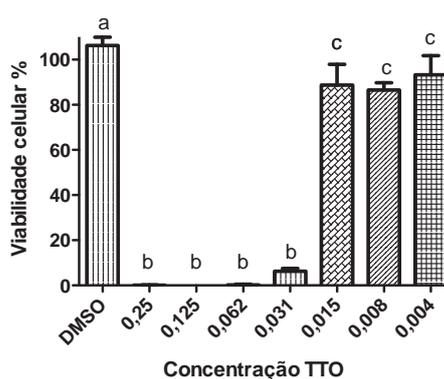


Figura 2. Viabilidade celular das diferentes concentrações do TTO. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA e pós teste Tukey, $p < 0.05$).

Para a análise do terpinen-4-ol, a Figura 3 mostra que os valores 0,238% e 0,119% foram citotóxicos para a linhagem celular U937 diferenciada em macrófagos.

Então, as concentrações deste composto, escolhidas para os experimentos foram a maior (0,059%) e menor (0,0073%).

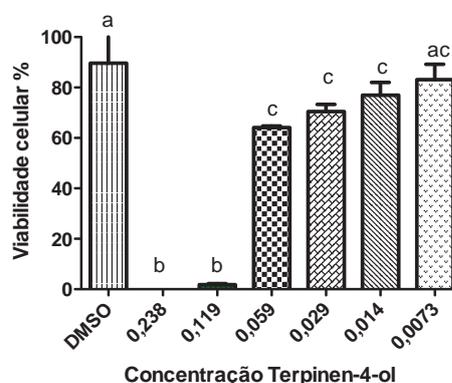


Figura 3. Viabilidade celular das diferentes concentrações do terpinen-4-ol. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA e pós teste Tukey, $p < 0.05$).

Ao testar o alfa-terpineol observou-se que nenhum valor adotado causou redução de viabilidade de 50% ou mais, em comparação ao controle negativo. Por isso, as concentrações de estudo foram 0,0064% e 0,0007%. Estas concentrações são similares às utilizadas para o terpinen-4-ol (Figura 4).

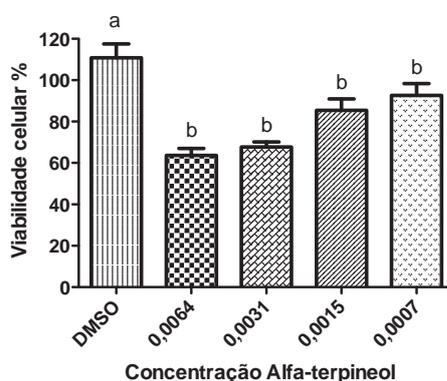


Figura 4. Viabilidade celular das diferentes concentrações do alfa-terpineol. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (ANOVA e pós teste Tukey, $p < 0.05$).

2 Análise da atividade modulatória do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol sobre a produção de citocinas produzidas por macrófagos

Para averiguar o efeito dos óleos sobre as citocinas produzidas por macrófagos, foi criado o controle negativo-tratamento com o mesmo volume dos óleos e sem LPS. Este grupo foi elaborado para verificação de um possível efeito dos óleos isoladamente sobre a produção das citocinas avaliadas (dados não apresentados – todos os resultados não apresentados no artigo estão no Anexo 1).

O tratamento das células com o veículo DMSO (controle negativo-veículo) não resultou em regulação da produção das citocinas investigadas (dados não apresentados), demonstrando que o veículo de diluição dos óleos foi inócuo nas concentrações utilizadas (como já verificado em relação à citotoxicidade).

TNF- α :

A Figura 5 A e B ilustra o efeito das maiores e menores concentrações do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol na secreção de TNF- α , por macrófagos induzidas por LPS de *E. coli* e *P. gingivalis*. Por sua vez o óleo de *Melaleuca alternifolia* e suas porções na presença do estímulo de TLR2 e TLR4 não influencia a produção desta citocina. Também não observamos qualquer efeito dos óleos na produção de TNF- α na ausência do estímulo de TLR 2 e 4 (dados não apresentados).

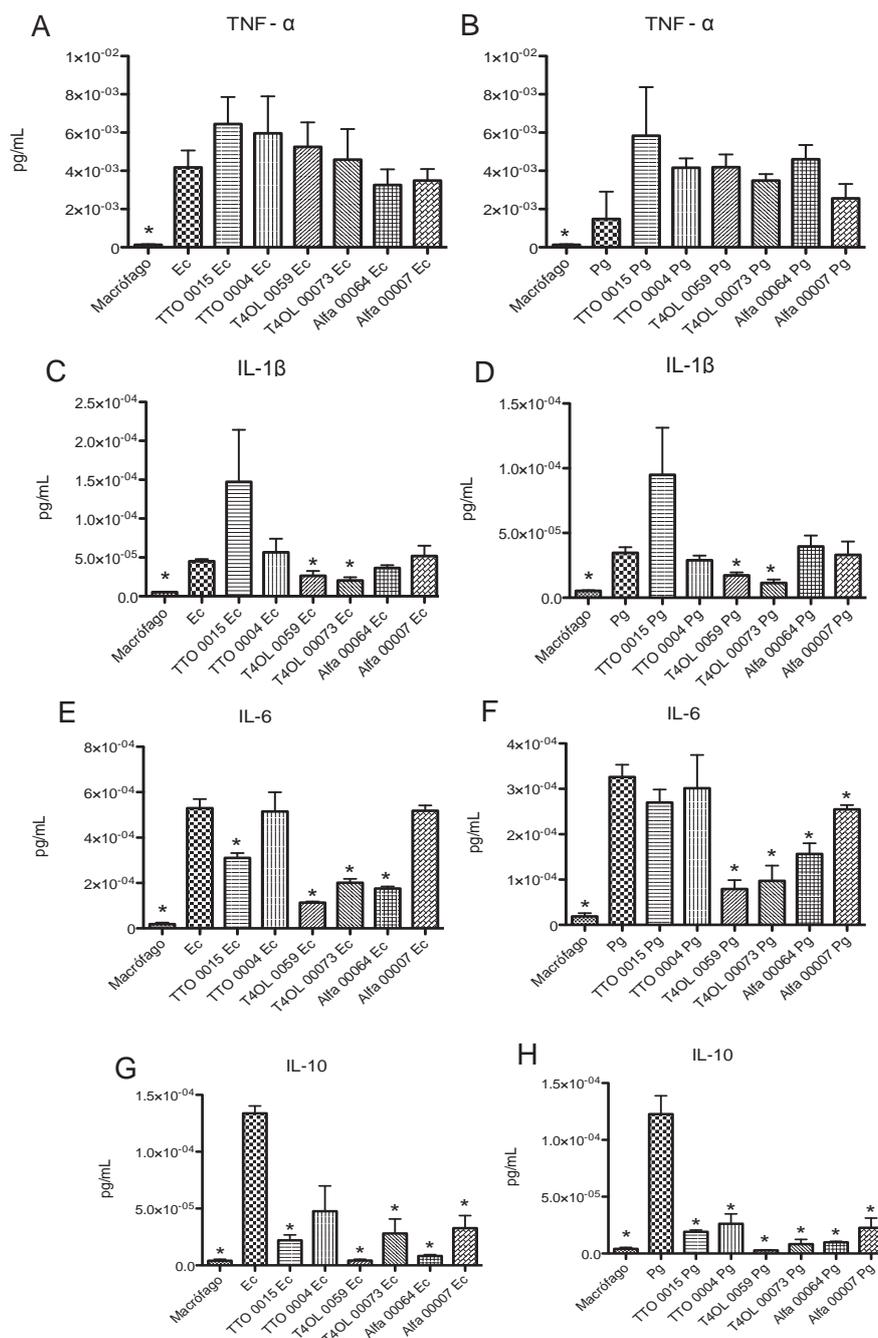


Figura 5. Efeito do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol diluídos em RPMI com 1% de soro fetal bovino em cultura de monócitos humanos (U937) diferenciados em macrófagos com 40ng/mL de PMA. Os óleos foram adicionados 2h antes dos estímulos com LPS de *E. coli* 1 μ g/mL (A, C, E e G) e *P. gingivalis* 1 μ g/mL (B, D, F e H). O LPS permanece por 24h até a coleta do sobrenadante para análise com ELISA. As concentrações dos óleos foram: TTO a 0,015% e 0,004%, terpinen-4-ol a 0,059% e 0,0073% e do alfa-terpineol a 0,0064% e 0,0007%. As citocinas analisadas foram TNF- α (A e B), IL-1 β (C e D), IL-6 (E e F) e IL-10 (G e H) representadas em pg/mL pelos histogramas. O Teste-t apontou a significância estatística entre o grupo controle positivo-estímulo e os demais grupos representados pelo asterisco * ($p < 0.05$).

Ao se utilizar inibidores conhecidos do NF- κ B e do ativador mitogênico da proteína quinase (Mitogen-activated protein kinases - MAP-Kinase) (BAY, PD e SB) e compará-los ao efeito dos óleos, pode-se observar (Figura 6 A e B) que a produção de TNF- α induzida pela ativação de TLR2 e 4 em macrófagos é dependente de NF- κ B, p38 MAP-Kinase e ERK.

IL-1 β :

O tratamento das células com o TTO não afetou a produção de IL-1 β em macrófagos induzidos via TLR2 e TLR4. Exceto para TTO 0,004% (Figura 5 C). Observa-se discreto (e não significativo) efeito sinérgico do TTO na produção de IL-1 β induzida por LPS *P. gingivalis* (Figura 5 D).

As duas concentrações testadas de terpinen-4-ol reduziram, de forma significativa, a produção de IL-1 β induzida pela ativação de TLR2 e 4. Vale ressaltar que, as concentrações 0,015% do TTO e 0,0073% do terpinen-4-ol são equivalentes. Os resultados aqui apresentados (Figuras 5 C e D) foram similares para o estímulo por LPS de *E. coli* e *P. gingivalis* o que pode ser um indício que o terpinen-4-ol atua após ativação de receptores TLR2 e TLR4. O alfa-terpineol não influenciou na produção de IL-1 β após a ativação de TLR4, mas para TLR2 produziu uma diminuição (Figura 5 C e D).

Os óleos sozinhos na ausência de ativação de TLR2 e 4 não produziram alterações significativas nos níveis de IL-1 β . No entanto, novamente observamos um efeito indutor (porém sem atingir significância estatística) do TTO na concentração de 0,015% (dados não apresentados).

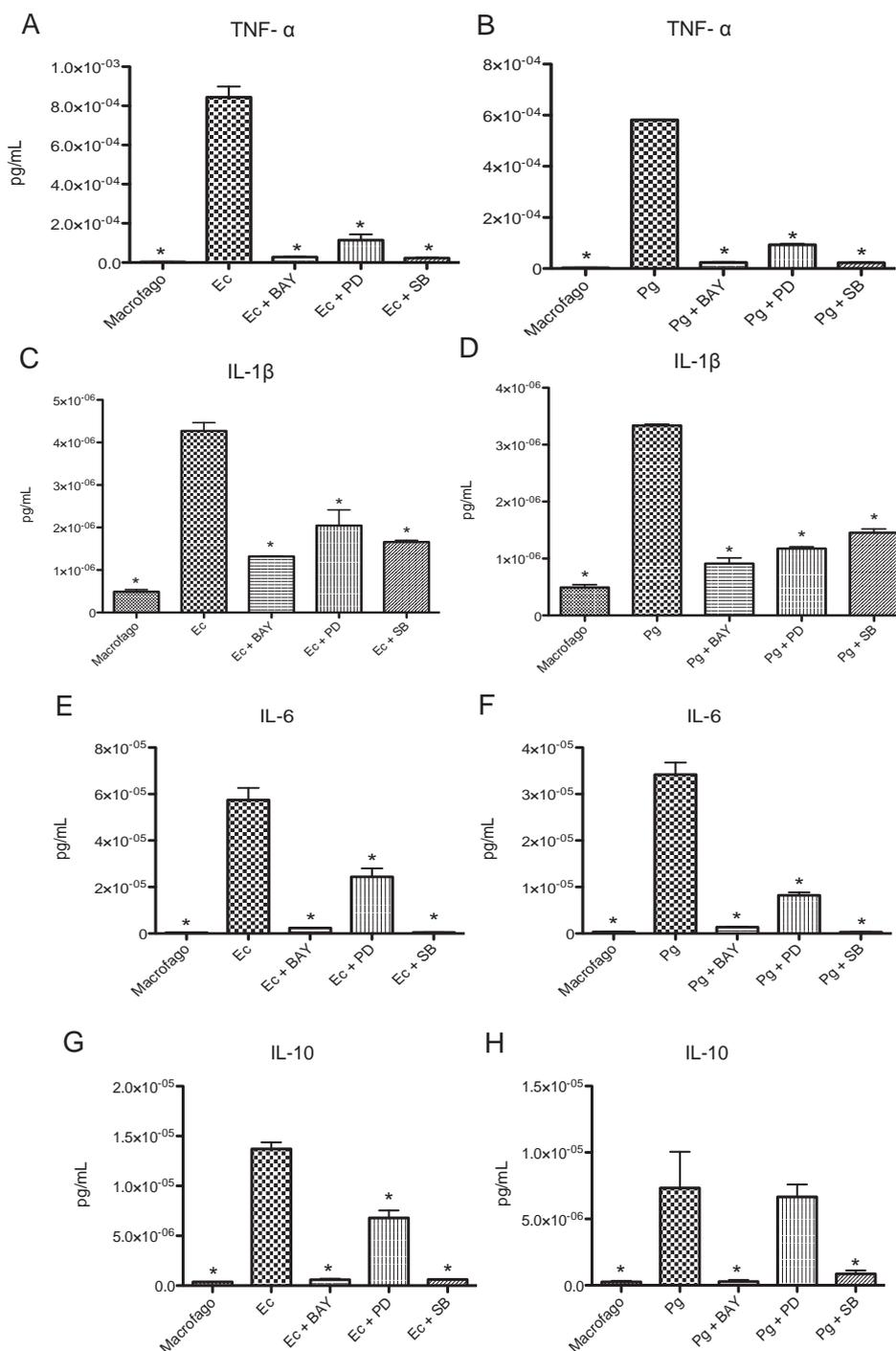


Figura 6. Efeito da ação dos inibidores BAY, PD e SB na secreção de TNF- α (A e B), IL-1 β (C e D), IL-6 (E e F) e IL-10 (G e H), produzidos por monócitos humanos (U937) diferenciados em macrófagos com 40ng/mL de PMA. Os inibidores foram adicionados 40 minutos antes dos LPS. As células foram estimuladas com LPS de *E. coli* 1 μ g/mL (A, C, E e G) *P. gingivalis* 1 μ g/mL (B, D, F e H) por 24h. As citocinas foram representadas em pg/mL por meio de histogramas. O Teste-t apontou a significância estatística entre o grupo controle positivo-estímulo e os demais grupos representados pelo asterisco * ($p < 0.05$).

Na Figura 6 C e D observamos que, a produção de IL-1 β por macrófagos após ativação de TLR2 e 4, é dependente de NF-kB, p38 MAP-Kinase e ERK.

IL-6:

Pode-se constatar, nos resultados apresentados na Figura 5 E e F que o TTO 0,015% reduziu de forma significativa a produção de IL-6 quando os macrófagos foram estimulados por LPS de *E. coli*. O terpinen-4-ol diminuiu tal citocina nas duas concentrações (0,059% e 0,0073%) após estimulação das células com os dois LPS.

A produção desta citocina também foi sensível à ação do alfa-terpineol (Figura 5 E e F). Os óleos individualmente não produziram alteração nos níveis de IL-6 (dados não apresentados).

A produção de IL-6 em macrófagos após ativação de TLR2 e 4 foi dependente de NF-kB e p38 MAP-Kinase e ERK (Figura 6 E e F).

IL-10:

Ao avaliar a produção de IL-10 por macrófagos observou-se que as concentrações dos óleos utilizados tiveram ação sobre tal citocina, diminuindo-a de forma significativa, tanto nas células ativadas via TLR4 quanto via TLR2 (Figura 5 G e H).

Sem a atuação de um estímulo com LPS de *E. coli* e *P. gingivalis*, o terpinen-4-ol 0,059% e alfa-terpineol 0,0064% promoveram uma queda, de forma significativa, nos níveis de IL-10. As demais concentrações não produziram alterações na produção de IL-10, na ausência de estímulo com LPS (dados não apresentados).

A Figura 6 G e H ilustra que a geração de IL-10 em macrófagos ativados por *E. coli* e *P. gingivalis* é dependente das vias NF- κ B e p38 MAP-Kinase. Na análise do bloqueio da ERK verificou que ela tem influência na inibição de IL-10 quando o TLR4 é ativado.

3 A ação redutora na produção de citocinas pelo TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol não é dependente das vias de sinalização NF- κ B, EKR e p38 MAP-Kinase

Os macrófagos estimulados com os respectivos óleos e sem o LPS não produziram modificações significativas nos níveis de NF- κ B e EKR. Entretanto, para p38 MAP-Kinase, o terpinen-4-ol revelou a presença de estímulo embora, não significativo (Figura 7).

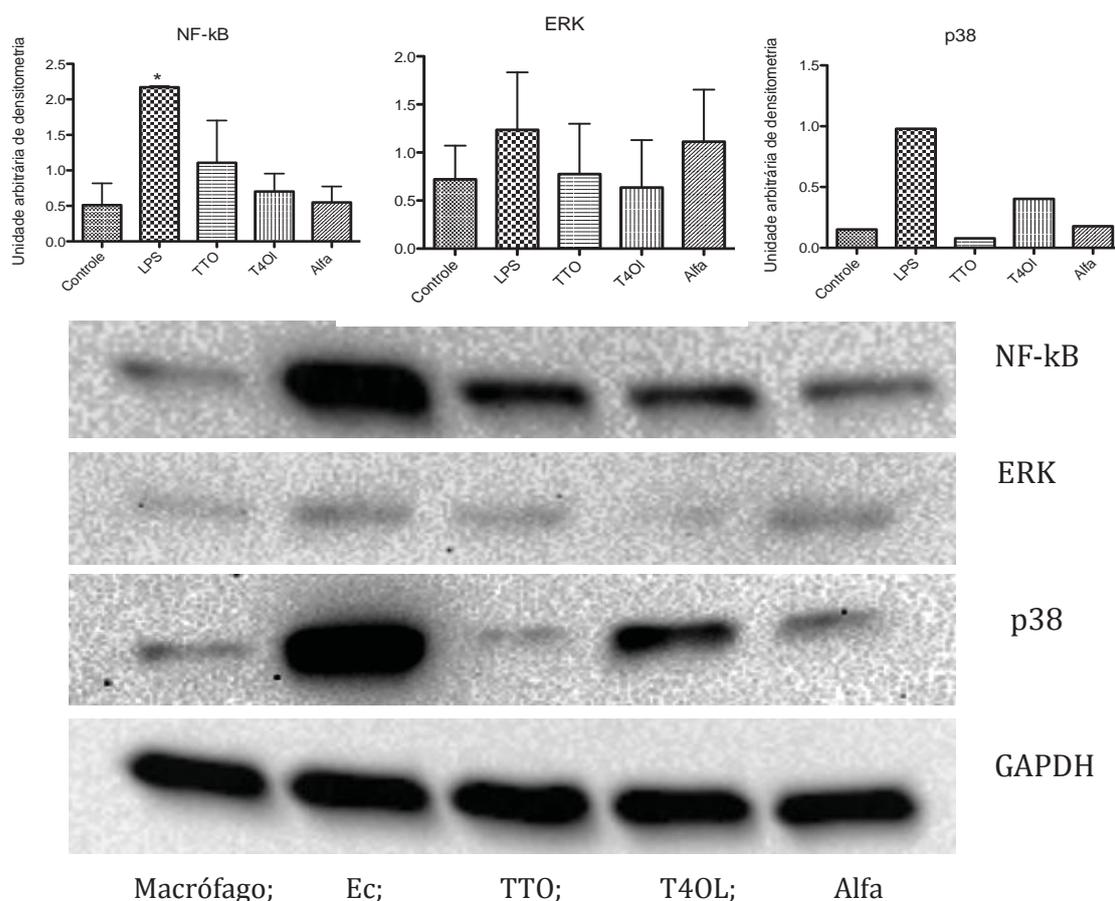


Figura 7. Os óleos foram diluídos em RPMI com 1% de soro fetal bovino e adicionados aos monócitos (U937) diferenciados em macrófagos, onde permaneceram por 2h até a remoção do lisado celular com inibidores de protease e fosfatase. O histograma representou a densidade arbitrária das bandas da membrana de western blot, após a normalização com GAPDH (37kDa). A membrana de western blot apresentou a seguinte distribuição: controle negativo, controle positivo-estímulo e os controle negativo-tratamento, isto é, o TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol sem estímulo de LPS. Os anticorpos analisados foram NF-kB (65kDa), ERK(65kDa) e p38 (42kDa). Para encontrar a diferença estatística representada pelo asterisco foi adotado o Teste-t comparando o grupo controle positivo-estímulo com os demais ($p < 0,05$).

A Figura 8 ilustra o resultado do western blot dos óleos, com LPS de *E. coli* e *P. gingivalis* por 10 minutos, sobre os macrófagos para os anticorpos NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinase. O TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol não apresentaram modulações significativas nos níveis de NF-kB e ERK (Figura 8). O TTO aparenta inibir discretamente a expressão de p38, quando os macrófagos são ativados via

agonista de TLR4. O terpinen-4-ol e alfa-terpineol parecem estimular a via do p38 tanto na ativação do TLR2 quanto no TLR4, apesar de este estímulo não ser estatisticamente significativo.

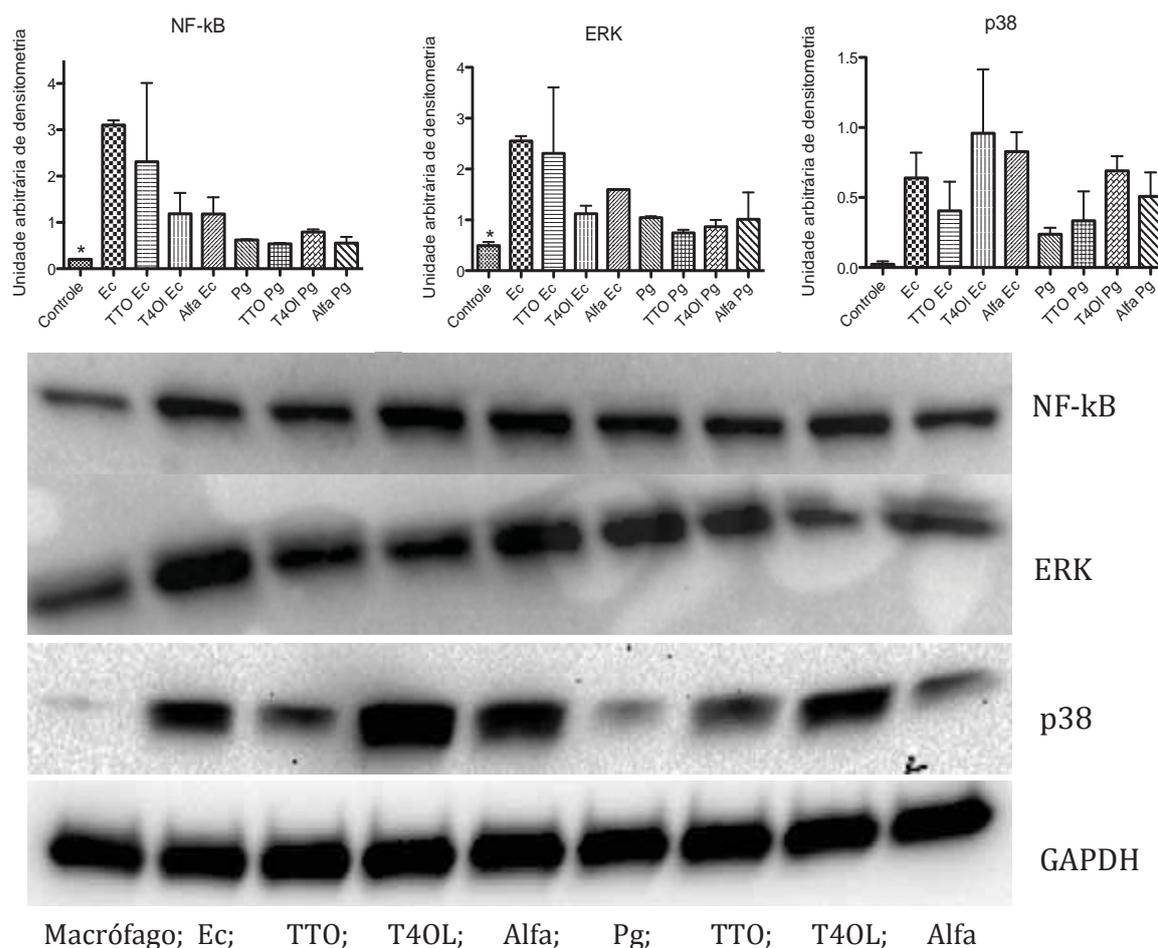


Figura 8. Os óleos foram diluídos em RPMI com 1% de soro fetal bovino e adicionados aos monócitos (U937) diferenciados em macrófagos, onde permaneceram por 2h até a adição do LPS *E. coli* 1 μ g/mL e *P. gingivalis* 1 μ g/mL por 10 minutos e somente depois o lisado celular foi obtido. O histograma representou a densidade arbitrária das bandas da membrana de western blot após a normalização com GAPDH (37kDa). A membrana de western blot apresentou a seguinte distribuição: controle negativo, controle positivo-estímulo e os grupos experimentais-tratamento, isto é, o TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol com estímulo do LPS. Os anticorpos analisados foram NF-kB (65kDa), ERK(65kDa) e p38 (42kDa). Para encontrar a diferença estatística representada pelo asterisco foi adotado o Teste-t comparando o grupo controle positivo-estímulo com os demais ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi investigado o potencial do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol, em modular a produção de citocinas, mais especificamente, da imunidade inata, em experimentos *in vitro* com macrófagos humanos. Verificamos que o óleo de *Melaleuca alternifolia*, em particular seu componente terpinen-4-ol, podem inibir significativamente a produção de citocinas associadas à resposta imune inata em macrófagos após estímulo dos mesmos via TLR4 e TLR2.

A composição do óleo pode variar de acordo com a forma de extração e a região geográfica onde foi obtido, por isso para ser designado como TTO a ISO 4730 determinou o padrão de concentração dos componentes conhecidos (1). A cromatografia gasosa, além de informar o enquadramento do TTO nos padrões da ISO 4730, expressou as concentrações relativas do terpinen-4-ol e alfa-terpineol. Com isto chegaram-se aos valores adotados, que fossem equivalentes ao TTO.

Hart et al. (10) separaram a fase aquosa da oleosa do óleo e encontraram que, o terpinen-4-ol e o alfa-terpineol estavam presentes na aquosa quando cultivados em frascos de plástico. No presente trabalho, as células foram cultivadas em frascos de plástico, além disso foi também adicionado o agente solubilizante, DMSO, que comprovadamente não teve influência nos resultados. O DMSO se fazia necessário para homogeneizar os resultados, uma vez que foram utilizados no TTO também adicionou-se o DMSO ao terpinen-4-ol e alfa-terpineol.

O óleo e seus componentes poderiam ter efeito citotóxico, o que inibiria a produção de citocinas devido à indução de morte celular, e assim inicialmente avaliamos a citotoxicidade em experimentos de dose-resposta (10, 31). A maior concentração não citotóxica do TTO foi 0,015% e a menor 0,004%, foram

consideradas não citotóxica, aquela em que pelo menos 50% de células estavam viáveis (em comparação ao controle).

O TNF- α está presente nos tecidos com doença periodontal, tem papel central na reação inflamatória e está associado à perda de inserção conjuntiva e epitélio juncional, além de reabsorção óssea. Os níveis de TNF- α produzidos pelos macrófagos não foram diminuídos por nenhum óleo, discordando dos resultados de Hart et al. (10). Estes autores verificaram que o terpinen-4-ol diminuía os níveis de TNF- α (Figura 5 A e B). A diferença entre o presente trabalho e de Hart et al. (10) pode ser devido ao tipo celular e o tempo de exposição ao óleo, uma vez que foram utilizados monócitos retirados de sangue periférico de doadores e os óleos ficaram atuando nas células durante 40h.

Na análise da modulação da produção de IL-1 β todos os óleos tiveram ação regulatória e esta ação não foi dose dependente. Entretanto o TTO somente teve ação quando da ativação do TLR4, em contrapartida o alfa-terpineol apenas exerceu efeito inibitório na produção de IL-1 β após a ativação TLR2. Somente o terpinen-4-ol atuou quando os dois diferentes agonistas foram estimulados (Figura 5 C e D).

A produção de IL-6 induzida via ativação de TLR4, mas não por TLR2, foi inibida por TTO (Figura 5 F), sugerindo que efeitos diferenciais do óleo nas vias de sinalização por diferentes TLRs. Esta diferença na função dos óleos, segundo o tipo de receptor preferencialmente ativado, pode ser devido às características específicas da sinalização de TLR2 e 4 em macrófagos. A porção citoplasmática de TLR2 pode interagir com as duas proteínas adaptadoras: o fator 88 de diferenciação mielóide (*Myeloid differentiation factor 88* -MyD88) e o domínio TIR contendo a proteína adaptadora/MyD88 (*TIR-domain containing adapter protein/MyD88 adapter-like* - TIRAP/MAL) (32, 33, 34).

A ativação de TLR4 pode recrutar quatro proteínas adaptadoras, além de MyD88 e TIR o adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon-beta (*TIR-domain containing adapter inducing INF- β* - TRIF) e a molécula adaptadora relacionada ao Trif (*TRIF-related adapter molecule* - TRAM) (32, 33,34). TRIF e TRAM estão relacionados com a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B, MAP-kinase e do fator 3 regulatório do interferon (interferon regulatory factor 3-IRF3) (36). É possível que TTO atue principalmente na sinalização de TLR4 MyD88 independente.

O terpinen-4-ol e alfa-terpineol baixaram os níveis de IL-6 induzidos por tanto por TLR4 quanto TLR2. Apesar do terpinen-4-ol e alfa-terpineol serem constituintes do TTO, a modulação da produção de IL-1 β e IL-6 através óleo total ser somente via ativação de TLR4, pode ser devido a influência dos outros componentes do óleo (Figura 5 E e F).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida possivelmente como um mecanismo endógeno regulador negativo da inflamação. Assim, o próprio estímulo inflamatório já induz também seu regulador negativo, como forma de controlar o processo e evitar danos excessivos aos tecidos do hospedeiro. A maior expressão de IL-10 em tecidos periodontais inflamados está associada a menor gravidade da doença (16).

Todos os óleos tiveram ação sobre a produção desta citocina diminuindo seus níveis (Figura 5 G e H), estando de acordo com o estudo de Hart et al. (10) que relataram que o TTO 0,125%, também reduziu os níveis de IL-10. Entretanto, para Chézet et al. (37) o TTO na concentração 0,01% em monócito e linfócitos humanos estimulados com lectina de *Phaseolus vulgaris* aumentou a secreção de IL-10. Neste

artigo, o terpinen-4-ol 0,062% também inibiu a produção de IL-10, os outros óleos e concentrações não modificaram os níveis desta citocina nas mesmas condições.

A produção das citocinas analisadas foi dependente das vias de sinalização NF- κ B, p38 MAP-Kinase e ERK, exceto a IL-10 induzida pela ativação preferencial de TLR2, que não foi dependente da ERK (Figura 7). Os dados indicam que na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 após estímulo de TLRs, todas as vias de sinalização avaliadas tem papel relevante. Interessante notar que IL-1 β , IL-6 e IL-10, mas não TNF- α , também foram inibidas pelo TTO e seus componentes. A não regulação de TNF- α pelo óleo e seus componentes pode ser interpretada de duas maneiras: 1) estes compostos não modulam estas vias de sinalização, podendo exercer seus efeitos por mecanismos alternativos; 2) um aspecto peculiar da regulação de TNF- α não é afetado por estes compostos.

Assim, para obter *insight* no mecanismo de ação dos óleos e seus componentes, avaliamos os possíveis efeitos destes compostos na ativação de NF- κ B, ERK e p38 MAP-Kinase. A escolha por estas vias de sinalização se deu porque, além de serem uma das mais estudadas, também estão envolvidas na modulação das citocinas analisadas.

Os resultados indicam que TTO e seus componentes não modulam a ativação de NF- κ B, ERK e p38 MAP-Kinase tanto na presença quanto na ausência do estímulo de TLR4 e TLR2 (Figura 8) justificando a não regulação de TNF- α . No entanto, a inibição da produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 pelo TTO e seus componentes (Figura 5 C e D) sugere a atuação por mecanismos alternativos, como, por exemplo, a modulação de outras vias de sinalização não analisadas neste estudo.

Como os dois componentes do TTO tem efeitos semelhantes na regulação da produção de citocinas inflamatórias, poder-se-ia antecipar um efeito aditivo ou

sinérgico no TTO resultando em potencialização dos efeitos regulatórios. No entanto, mesmo em concentrações de TTO que contém quantidades equivalentes dos componentes principais que se mostraram efetivas, não observamos este efeito sinérgico ou aditivo. Este fato pode ser atribuído a influencia dos outros componentes presentes no TTO, os quais podem exercer efeitos antagônicos ou neutralizadores aos efeitos de seus principais componentes. Este dado é relevante e deve ser considerado em futuras avaliações de seu emprego com finalidade terapêutica. Neste sentido, o terpinen-4-ol demonstrou ser o principal componente modulador da produção de citocinas com redução significativa nos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-10. O alfa-terpineol também apresentou efeito modulador sobre IL-1 β , IL-6 e IL-10.

Estudos in vivo tem demonstrado ação anti-inflamatória dos óleos e dos seus componentes, como a redução da hipersensibilidade de contato após aplicação tópica (38, 39), redução de edema (40), redução da vermelhidão cutânea (12, 41). Entretanto, ainda não há estudos sobre a ação do óleo em modelo de doença periodontal, um modelo de inflamação crônica iniciado e mantido por interações microbiota-hospedeiro.

No presente trabalho constatou-se o efeito modulador do TTO e principalmente do terpinen-4-ol sobre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias sendo que este efeito não foi mediado por influência na ativação de NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinase.

REFERÊNCIAS

1. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:50-62.
2. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001;91:492-7.
3. Keszei A, Hassan Y, Foley JW. A Biochemical Interpretation of Terpene Chemotypes in *Melaleuca alternifolia*. *J Chem Ecol.* 2010;36:652-61.
4. Shelton D, Zabarás D, Chohan S, Wyllie G, Baverstock P, Leach D, Henry R. Isolation and partial characterisation of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*. *Plant Physiol Biochem.* 2004;42:875-82.
5. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105:327-32.
6. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33:343-7.
7. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. Minami M. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol.* 2003;47:681-4.
8. Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res.* 2005;19:643-6.

9. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, Carson CF. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65:877-88.
10. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res.* 2000;49:619-626.
11. Abe S, Maruyama N, Hayama K, Ishibashi H, Inoue S, Oshima H, Yamaguchi H. Suppression of tumor necrosis factor- α -induced neutrophil adherence responses by essential Oils. *Mediators Inflamm.* 2003;12:323-8.
12. Koh KJ, Earce AL, Marshman G, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br J Dermatol.* 2002;147:1212-7.
13. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, Bagg J, Culshaw S. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol.* 2012;3:1-8.
14. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783-801.
15. Garfias CRB, Gualito JJM. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet Méx.* 2005;36:453-68.

16. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010;89:1349-63.
17. Gurgel BCV, Ribeiro EDP, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Casati MZ. Influência da resposta do hospedeiro e sua modulação na patogênese e terapia periodontal. *Rev Int Periodontia Clin.* 2005;2:38-44.
18. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32:130-1.
19. Souza JA, Rossa C Jr, Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012;20:28-38.
20. Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, Van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:145–51.
21. Buduneli N, Ozcxaka O, Nalbantsoy A. Salivary and Plasma Levels of Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 in Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2011;82:878-84.
22. Eskin MA, Rose BG, Benakanakere MR, Zeng Q, Fujioka D, Martin MH, Lee MJ, Kinane DF. TLR4 and S1P receptors cooperate to enhance inflammatory cytokine production in human gingival epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:1138-47.

23. Ryan ME. Clinical applications for host modulatory therapy. *Compend Contin Educ Dent.* 2002;23:1071-6,1079-80,1082.
24. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76:2779-83.
25. Medzhitov R. Toll like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2001;1:135-45.
26. Feldman M, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins act in synergy with licochalcone A to reduce *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence properties, and to suppress cytokine secretion by macrophages. *Journal of Applied Microbiology.* 2012;113, 438–47.
27. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem.* 1995;270:27489-94.
28. Barancík M, Boháčová V, Kvackajová J, Hudecová S, Krizanová O, Breier A. SB203580, a specific inhibitor of p38-MAPK pathway, is a new reversal agent of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur J PharmSci.* 2001;14:29-36.
29. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF- κ B and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 2002;100:1828-34.

30. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:48-254.
31. Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, Hart PH. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm Res.* 2001;50:213-9.
32. Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology* 2000. 2010;54:53-70.
33. Shirakawa F, Mizel SB. In vitro activation and nuclear translocation of NF- κ B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 1989;9:2424-30.
34. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 1995;14:2876-83.
35. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antim Agents.* 2008;31:272-6.
36. Lu YC, Yeh WC, Ohashi OS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42:145-51.

37. Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, Guillot J. Potencial anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother Res.* 2006;20:364-70.
38. Brand C, Grimbaldston MA, Gamble JR, Drew J, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. *Inflamm. Res.* 2002;51:236-44.
39. Pearce AL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Reduction of nickel-induced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. *Inflamm Res.* 2005;54:22-30.
40. Brand C, Townley SL, Finlay-Jones JJ, and Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced edema in murine ears. *Inflamm Res.* 2002;51:283-289.
41. Khalil Z, Pearce AL, Satkunanathan N, Storer E, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. *J Invest Dermatol.* 2004;123:683-90.

CAPÍTULO 2

“Terpinen-4-ol, o mais abundante componente do óleo de *Melaleuca alternifolia* diminui a produção de INF- γ e IL-17 em U937 estimulados com LPS de *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*”

* Artigo seguiu as normas do periódico Inflammation Research.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a capacidade de modulação de citocinas pelo óleo de *Melaleuca alternifolia* (TTO) e seus componentes (terpinen-4-ol e o alfa-terpienol) e analisar se as vias de sinalização celular *Nuclear factor kappa B*, Extracellular signal-regulated kinases e P38 mitogen-activated protein kinases participaram neste processo.

Métodos: O efeito modulatório foi avaliado em monócitos (U937) diferenciados em macrófagos com Phorbol 12-myristate 13-acetate, e estimulados com lipopolissacarídeos. A citotoxicidade dos óleos foi verificada com o ensaio de MTT. A influência dos óleos sobre a produção de INF- γ , IL-4, IL-12 e IL-17 foi realizada por ELISA, e para determinar os níveis de NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinase foi utilizado o western blot.

Resultados: O TTO e o alfa-terpineol nas concentrações estudadas não tiveram influência sobre as citocinas analisadas. Já o terpinen-4-ol reduziu de forma significativa os níveis de INF- γ , IL-4 e IL-17 para IL-12 a ação não foi efetiva. As vias de NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinase não influenciaram na diminuição da expressão de citocinas.

Conclusões: O terpinen-4-ol é o principal componente ativo do TTO com capacidade de suprimir a produção de INF- γ , IL-4 e IL-17. O mecanismo de ação do óleo não se dá pela inibição das vias NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinase.

Palavras-chave: Óleo de *Melaleuca*, macrófagos, citocinas, inflamação.

INTRODUÇÃO

O TTO (Tea tree oil) é originário de uma planta nativa da Austrália, a *Melaleuca alternifolia*. Formado por uma complexa mistura de óleos essenciais, o TTO possui mais de 100 componentes, sendo alguns deles um o terpinen-4-ol e o alfa-terpineol, e possui conhecidas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória e anticancerosa [1, 2, 3, 5, 6, 7, 8].

A ação anti-inflamatória do TTO se dá por diminuição da produção de espécies reativas do oxigênio por monócitos e leucócitos [9, 10] e é ineficiente para a quimiotaxia de leucócitos [9]. O TTO possui ação na secreção de citocinas, no entanto, seu papel na regulação intracelular das vias de sinalização na produção destas citocinas ainda é pouco conhecida, mas sabe-se que seu principal componente ativo é o terpinen-4-ol [4].

A resposta imune adaptativa inicia-se com o reconhecimento de patógenos pelos receptores Toll-like (TLR) na superfície de células imunes e consequente produção de citocinas como interferon gama (INF- γ), interleucina-4 (IL-4), interleucina-12 (IL-12) e interleucina-17 (IL-17) [11, 12, 13, 14].

O objetivo destes eventos é reconhecer e combater os periodontopatógenos como, por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*. Sabe-se que a destruição dos tecidos de suporte dos dentes é causada pela resposta imune contra os periodontopatógenos e não diretamente pela infecção destes microrganismos. Este reconhecimento leva a ativação de vias de sinalização celular que chegam ao núcleo por meio de fatores de transcrição e irão produzir citocinas inflamatórias. Uma dessas vias é conhecida como ativador mitogênico da proteína kinase (MAP-Kinase) e sua ativação resulta na fosforilação de fatores de transcrição por meio de

vias como a ERK, c-JUN e p38 MAP-Kinase que são expressas na doença periodontal [15].

A doença periodontal é considerada uma das principais causas de perda dentária. Resulta na diminuição ou alteração dos tecidos de proteção e sustentação dos órgãos dentários e, tem na sua patogênese, o envolvimento de fatores microbianos, resposta imunológica do hospedeiro interferindo na produção de citocinas como INF- γ , IL-4, IL-12 e IL-17, além de poder ser modulada por fatores locais, ambientais e genéticos [16, 17, 11, 12, 13, 14].

As terapêuticas que antagonizam a produção de citocinas, como o uso de inibidores de vias de sinalização celular como a MAP-Kinase ou NF-kB, podem atenuar ou controlar o desenvolvimento da doença periodontal, influenciando na inflamação e na reabsorção óssea, e são consideradas uma nova modalidade de tratamento periodontal [12].

Ainda não está clara a ação e a atividade imunomodulatória do TTO, mas sabe-se que esta substância pode diminuir a produção de citocinas inflamatórias (4). A proposta deste trabalho foi investigar a ação do TTO e dois de seus componentes (terpinen-4-ol e alfa-terpineol) na expressão de INF- γ , IL-4, IL-12 e IL-17 e na modulação das vias de sinalização da MAP-Kinase em macrófagos humanos ativados por LPS de *P. gingivalis* (agonista TLR2) e de *E. coli* (agonista TLR4).

MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias utilizadas deste artigo já foram descritas no artigo 1.

ANÁLISE DOS DADOS

A normalidade da distribuição dos dados foi verificada aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk e o valor de $p < 0,05$ para significância. A análise estatística teve o objetivo de determinar a significância dos efeitos do óleo de *Melaleuca alternifolia* e seus componentes nos desfechos de interesse. Para a viabilidade celular, com a comparação entre todas as concentrações dos óleos foi utilizado o teste ANOVA. Expressão de citocinas inflamatórias com acareação do grupo controle e a análise da ativação das vias de sinalização intracelular adotou-se o Teste-t. Os programas utilizados para a obtenção dos gráficos e análise estatística foi o GraphPad Prim 5.

RESULTADOS

1 Viabilidade celular

No capítulo 1 foi descrito a obtenção destes resultados e as doses não citotóxicas foram para o TTO 0,015% e 0,004%, Terpinen-4-ol 0,059% e 0,0073% e para o Alfa-terpineol 0,0064% e 0,0007%.

2 Efeito do TTO, Terpinen-4-ol e alfa terpineol na modulação de citocinas inflamatórias induzida por LPS em macrófagos.

INF- γ :

A Figura 4 (A e B) ilustra o efeito das maiores e menores concentrações do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol na secreção de INF- γ , induzidas por LPS de *E. coli* e *P. gingivalis*. Na Figura 4 (A e B) pode-se observar que os macrófagos, com as diluições do TTO, quando estimulado com LPS de *E. coli* e *P. gingivalis*, não produziram alterações detectáveis nos níveis de INF- γ .

Para a porção terpinen-4-ol, apesar de ter diminuído os níveis de INF- γ a diferença não foi significativa (Figura 4 A). Os resultados demonstram (Figura 4 B) que as células expostas a porção terpinen-4-ol na menor concentração (0,0073%) na presença de LPS de *P. gingivalis* diminuíram os níveis de INF- γ . Os resultados apontam também uma tendência de redução para a concentração 0,059% ($p < 1$) indicando que, para o terpinen-4-ol, o mecanismo de ação se dá quando da ativação de TLR2.

O alfa-terpineol não foi capaz de inibir significativamente a produção de INF- γ por macrófagos (Figura 4 A e B) e somente a concentração 0,0007% em células estimuladas via TLR2 apresentaram uma redução.

Para verificar se os óleos individualmente, sem a adição de LPS de *E. coli* ou *P. gingivalis*, estimulavam a produção de citocinas, realizamos experimentos na ausência dos LPS. Para o TTO 0,015% observou-se pequeno aumento de INF- γ . O alfa-terpineol 0,0007% provocou diminuição significativa dos níveis desta citocina, mesmo sem a adição de LPS. Para os demais óleos, não foi observado alterações (dados não apresentados).

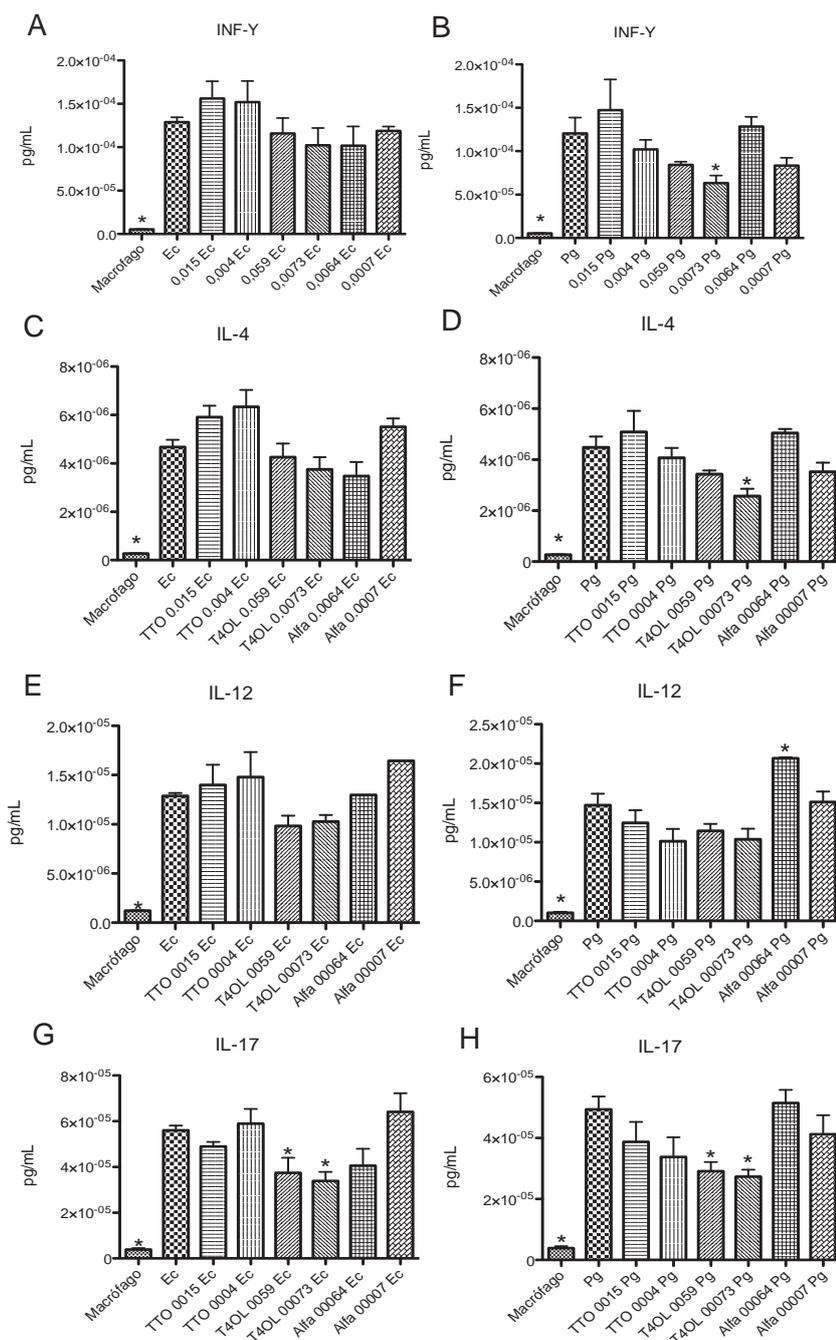


Figura 4. Efeito do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol diluídos em RPMI com 1% de soro fetal bovino em cultura de monócitos humanos (U937) diferenciados em macrófagos com 40ng/mL de PMA. Os óleos foram adicionados 2h antes dos estímulos com LPS de *E. coli* 1 μ g/mL (A, C, E e G) e *P. gingivalis* 1 μ g/mL (B, D, F e H). O LPS permanece por 24h até a coleta do sobrenadante para análise com ELISA. As concentrações dos óleos foram: TTO a 0,015% e 0,004%, terpinen-4-ol a 0,059% e 0,0073% e do alfa-terpineol 0,0064% e 0,0007%. As citocinas analisadas foram INF- γ (A e B), IL-4 (C e D), IL-12 (E e F) e IL-17 (G e H) representadas em pg/mL pelos histogramas. O Teste-t apontou a significância estatística entre o grupo controle positivo-estímulo e os demais grupos representados pelo asterisco * ($p < 0,05$).

Foram utilizados inibidores conhecidos de NF- κ B, p38 MAP-Kinase e ERK para compará-los ao efeito dos óleos, pode-se observar na Figura 5 A e B que a produção de INF- γ induzida pela ativação de TLR2 e 4 em macrófagos é dependente de NF- κ B, p38 MAP-Kinase e ERK.

IL-4:

A Figura 4 C e D ilustram os resultados dos óleos na secreção de IL-4 por macrófagos induzidos com LPS de *E. coli* e *P. gingivalis*. Para o TTO, quando os monócitos diferenciados em macrófagos, foram estimulados com *E. coli* o valor de p foi $p < 1$, revelando uma tendência a aumentar os níveis de IL-4.

Pode-se observar que o terpinen-4-ol 0,0073% foi a única porção que reduziu os níveis de IL-4 de forma significativa via TLR2 (Figura 4 D). A concentração 0,0059% também diminuiu IL-4 de modo não significativo, contudo, revelando uma tendência à redução ($p < 1$). Esta citocina apresentou resultados semelhantes aos de INF- γ quando comparados à condição sem estímulo de LPS (dados não apresentados).

Na Figura 5 C e D, observamos que a produção de IL-4 por macrófagos após ativação de TLR2 e 4 é dependente de NF- κ B, p38 MAP-Kinase e ERK.

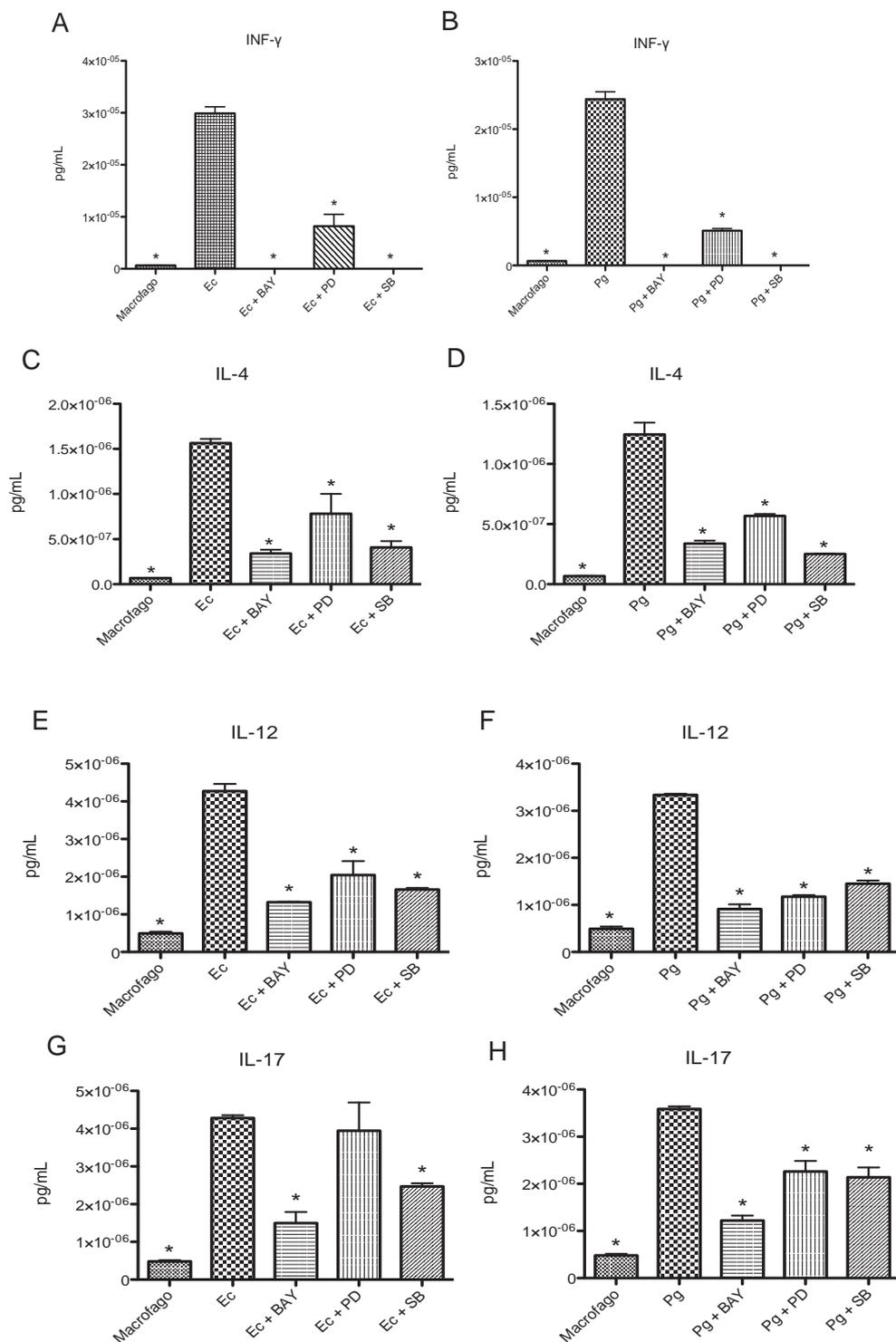


Figura 5. Efeito da ação dos inibidores BAY, PD e SB na secreção de INF- γ (A e B), IL-4 (C e D), IL-12 (E e F) e IL-17 (G e H), produzidos por monócitos humanos (U937) diferenciados em macrófagos com 40ng/mL de PMA. Os inibidores foram adicionados 40 minutos antes dos LPS. As células foram estimuladas com LPS de *E. coli* 1 μ g/mL (A, C, E e G) *P. gingivalis* 1 μ g/mL (B, D, F e H) por 24h. As citocinas foram representadas em pg/mL por meio de histogramas. O Teste-t apontou a significância estatística entre o grupo controle positivo-estímulo e os demais grupos representados pelo asterisco * (p<0,05).

IL-12:

Os resultados (Figura 4 E e F) revelaram que o TTO não produziu alterações significativas nos níveis de IL-12, embora a concentração 0,0004% estimulado por LPS de *P. gingivalis* tenha demonstrado uma tendência de redução ($p < 1$) (Figura 4 F).

Para os macrófagos com terpinen-4-ol 0,059% e 0,0073% estimulado tanto por via TLR2 quanto TLR4, apesar de não ter acarretado em uma diminuição significativa, mostraram tendência de atenuação da IL-12 ($p < 0,1$) (Figura 4 E e F).

O alfa-terpineol 0,0064% após estímulo com LPS de *P. gingivalis* elevou a produção de IL-12 por macrófagos de forma significativa (Figura 4 F). O óleo e seus componentes sozinhos não acarretaram alterações nos níveis IL-12 (dados não apresentados).

A Figura 5 E e F ilustra o efeito da ativação de TLR4 e 2 na produção de IL-12 e verifica-se que foi dependente de NF- κ B e p38 MAP-Kinase e ERK.

IL-17:

A Figura 4 G e H ilustra os resultados para IL-17. Pode-se observar que a porção terpinen-4-ol apresentou modulação de IL-17, atuando via os dois receptores Toll analisados. Os demais óleos utilizados não induziram alterações na produção desta citocina. Os óleos sozinhos não apresentaram alterações nos níveis de IL-17 (dados não apresentados)

A produção de IL-17 em macrófagos após ativação de TLR2 e 4 foi dependente de NF- κ B e p38 MAP-Kinase. Já quando os macrófagos foram ativados via TLR4 a modulação secreção de IL-17 por macrófagos não foi dependente de ERK (Figura 5 G).

3 Western Blot

A Figura 12 ilustra os resultados do Western blot dos óleos sem estímulo com LPS para os anticorpos NF-kB, ERK e p38. Os óleos sem os LPS não induziram, de forma significativa, as vias de sinalização estudadas (Figura 6).

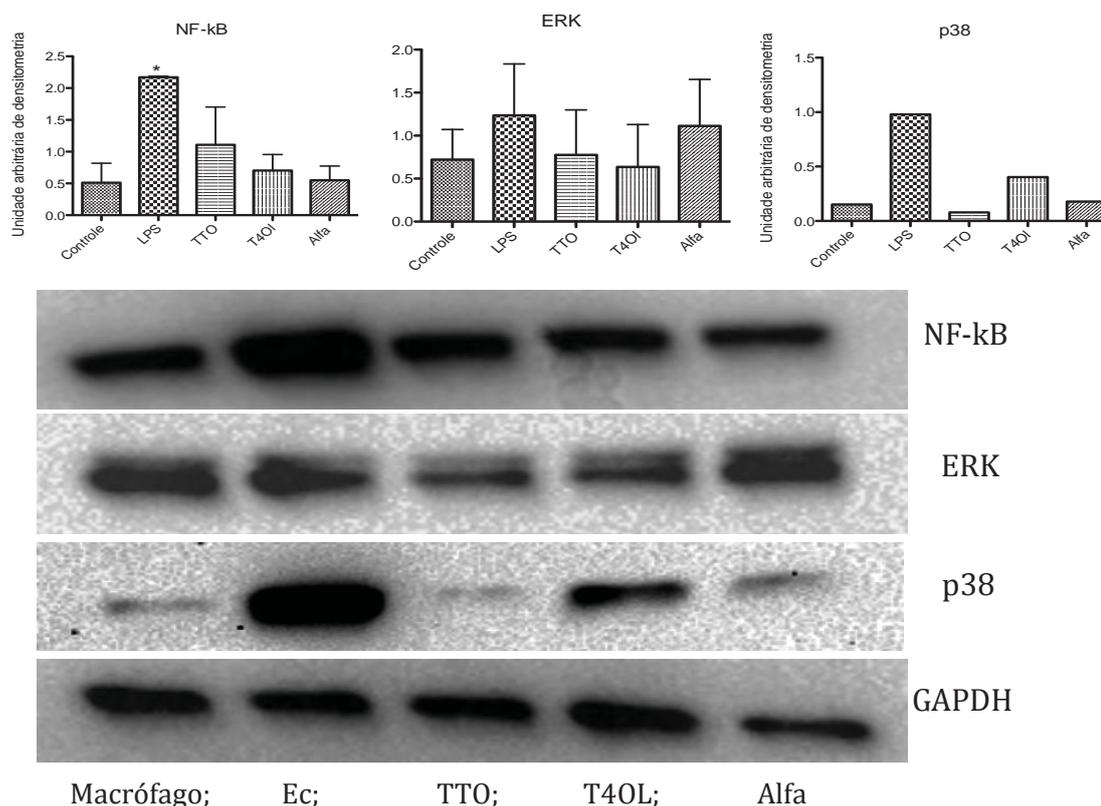


Figura 6. Os óleos foram diluídos em RPMI com 1% de soro fetal bovino e adicionados aos monócitos (U937) diferenciados em macrófagos, onde permaneceram por 2h até a remoção do lisado celular com inibidores de protease e fosfatase. O histograma representou a densidade arbitrária das bandas da membrana de western blot após a normalização com GAPDH (37kDa). A membrana de western blot apresentou a seguinte distribuição: controle negativo, controle positivo-estímulo e os controle negativo-tratamento, isto é, o TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol sem estímulo de LPS. Os anticorpos analisados foram NF-kB (65kDa), ERK(65kDa) e p38 (42kDa). Para encontrar a diferença estatística representada pelo asterisco foi adotado o Teste-t comparando o grupo controle positivo-estímulo com os demais ($p < 0,05$).

A Figura 7 mostra os resultados do western blot dos óleos com LPS de *E. coli* por 10 minutos para os anticorpos NF-kB, ERK e p38. O TTO não produziu alterações significativas nos níveis de NF-kB e ERK. (Figura 7). O TTO parece inibir

um pouco o p38, mas não fortemente, quando ativado via agonista de TLR4. O terpinen-4-ol e alfa-terpineol parecem estimular tanto na ativação do TLR2 quanto no TLR4.

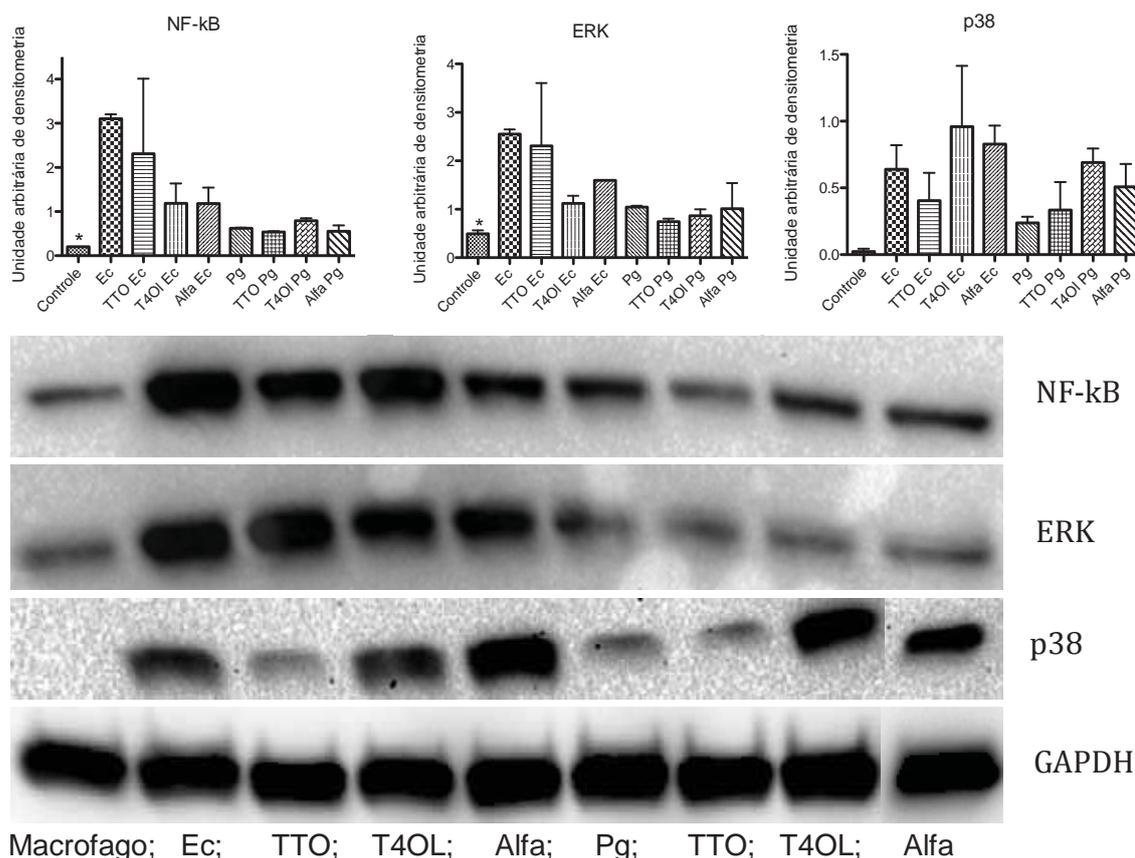


Figura 7. Os óleos foram diluídos em RPMI com 1% de soro fetal bovino e adicionados aos monócitos (U937) diferenciados em macrófagos, onde permaneceram por 2h até a adição do LPS *E. coli* 1 μ g/mL e *P. gingivalis* 1 μ g/mL por 10 minutos e somente depois o lisado celular foi obtido. O histograma representou a densidade arbitrária das bandas da membrana de western blot após a normalização com GAPDH (37kDa). A membrana de western blot apresentou a seguinte distribuição: controle negativo, controle positivo-estímulo e os grupos experimentais-tratamento, isto é, o TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol com estímulo do LPS. Os anticorpos analisados foram NF-kB (65kDa), ERK(65kDa) e p38 (42kDa). Para encontrar a diferença estatística representada pelo asterisco foi adotado o Teste-t comparando o grupo controle positivo-estímulo com os demais ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O TTO tem uma complexa composição química e para entender melhor sua ação, foram escolhidos componentes solúveis do óleo, o terpinen-4-ol e o alfa-terpineol. Para chegar nas concentrações dos componentes foi realizada a cromatografia para detectar o seu real percentual no óleo, que foi utilizado na pesquisa, e dessa forma, utilizar concentrações dos componentes equivalentes com o TTO. Esta abordagem foi utilizada para tentar identificar o principal princípio ativo do TTO em termos de sua atividade imuno regulatória.

Como os óleos seriam aplicados diretamente sobre as células foi necessário fazer o teste de citotoxicidade e as maiores e menores concentrações não citotóxica foram adotadas no estudo. Foram elas: TTO 0,015% e 0,004%, terpinen-4-ol 0,059% e 0,0073% e para o alfa-terpineol 0,0064% e 0,0007%. A concentração não citotóxica foi arbitrariamente considerada como aquela em que pelo menos 50% de células viáveis (em comparação ao controle).

A IL-17 e INF- γ mediam a atividade de TNF- α e IL-1 β . A IL-12, por sua vez, ativa a produção de INF- γ , enquanto IL-4 inibe a transcrição de citocinas inflamatórias controlando e atenuando a inflamação [12, 24, 25]. O TTO e seus componentes podem modular a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10 e IL-12 [4, 9] por células da resposta imune inata, citocinas estas que podem ser reguladas pela resposta adaptativa. Na literatura não há informações sobre a ação do TTO e seus componentes na modulação de IL-17 e INF- γ .

A extrapolação dos achados do presente trabalho sobre os efeitos do óleo na modulação da resposta adaptativa será feita com cuidado, mas uma vez que poderíamos ter a indução diretamente por estímulo de TLRs ou, principalmente, pela

ação de outras citocinas (as quais, sim, foram diretamente induzidas pela ativação de TLRs).

Estudos com monócitos estimulados com LPS demonstraram redução significativa de TNF- α , IL-1 β e PGE₂ para TTO 0,125% e de TNF- α , IL-1 β , PGE₂ e IL-8 para terpinen-4-ol 0,052%. Para o alfa-terpineol 0,004% não foram encontradas nenhuma ação sobre a produção destas citocinas. As concentrações foram semelhantes ao do presente trabalho, mas com uma pequena variação devido a composição do óleo. Por se tratar de uma planta, ela pode vir de regiões diferentes e o óleo originado pode variar na proporção dos componentes. O TTO analisado encontrava-se dentro dos padrões da ISO 4730 [4].

O INF- γ é considerado um mediador chave da inflamação, por ativar macrófagos induzindo a fagocitose e a secreção de mediadores como IL-1, IL-6 e TNF- α . Ainda INF- γ está associado à progressão e severidade da doença periodontal como demonstrada em experimentos in vivo [11, 14, 26]. Entretanto, há controvérsias no papel desta citocina pois, pesquisas in vitro têm revelado que o tratamento com INF- γ inibe a osteoclastogênese, apontando uma correlação negativa entre doença periodontal e níveis de INF- γ , conferindo a este um papel protetor para o paciente [27, 28].

Uma explicação para este papel protetor seria que o INF- γ teria ação na regulação negativa na osteoclastogênese. Seu efeito inibitório se daria quando, na presença de receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL) e o INF- γ proporcionaria a degradação do fator 6 associado ao receptor de TNF citoplasmático (*TNF receptor associated factor 6* - TRAF6), inibindo a sinalização de RANKL e consequente osteoclastogênese [12, 13, 27].

O TTO ocasionou um aumento de INF- γ , entretanto não significativo para o agonista de TLR4 (Figura 4 A). O terpinen-4-ol, por sua vez, apresentou tendência (não estatisticamente significativa) de redução da produção de INF- γ , atingindo significância estatística apenas após o estímulo com o agonista preferencial de TLR2. Considerando a não modificação nos níveis de INF- γ na presença do TTO e dos seus componentes entende-se que o óleo não interfere na produção desta citocina.

Citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 controlam e atenuam o desenvolvimento da doença periodontal inibindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, regulando e elevando níveis de osteoprotegerina (OPG). Estão geralmente associadas com a baixa severidade da doença [12].

O TTO apresentou tendência (não significativa estatisticamente) de aumentar a produção de IL-4, ao contrário da tendência de redução (também não significativa) observada para terpinen-4-ol. Somente para o estímulo com *P. gingivalis* (agonista de TLR2) foi observada redução significativa da produção de IL-4 para concentração de terpinen-4-ol (0,0073%). O alfa-terpineol não afetou produção de IL-4 (Figura 6). O trabalho de Chézet et al. [9] encontraram que o IL-4 foi induzido quando utilizado o TTO na concentração 0,01% em monócito e linfócitos humanos estimulados com lectina de *Phaseolus vulgaris*.

IL-12 é uma citocina pró-inflamatória associada ao padrão de resposta Th1. A diminuição da inflamação com tratamento periodontal está associada a uma redução dos níveis de IL-12 nos tecidos [12]. Os níveis de IL-12 não foram modulados por nenhum dos componentes testados (Figura 8).

IL-17 inclui três membros de família de citocinas, com marcante relevância na resposta adaptativa por sua ação mediadora da atividade de citocinas associadas à

resposta imune inata; além de contribuir para a formação de osteoclastos com consequência na modulação da reabsorção óssea inflamatória, por exemplo na doença periodontal destrutiva [11, 12, 13, 14].

A IL-17 liga-se ao receptor IL-17R, agentes terapêuticos que antagonizam esta sinalização são uma opção clínica, para tratamento de doenças inflamatórias que não respondem a terapia convencional [24]. O terpinen-4-ol reduziu significativamente a produção de IL-17 induzida tanto por agonista de TLR2 quanto por agonista de TLR4, sendo este efeito dose independente (Figura 10).

A produção de citocinas analisadas por macrófagos após ativação de TLRs é dependentes das vias NF-kB, p38 MAP-Kinase e ERK, exceto a IL-17 que não foi dependente da ERK quando ativada por TLR4 (Figura 11). Como o óleo e seus componentes não modularam a ativação de NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinases efeitos modulatórios destes compostos não são mediados por estas vias (Figuras 12 e 13).

Os resultados do presente estudo revelam que o componente do óleo com maior atividade modulatória na produção das citocinas avaliadas é também o mais abundante na composição do TTO, o terpinen-4-ol. O óleo total não tem ação sobre a produção de INF- γ , IL-4, IL-12 e IL-17, entretanto, o terpinen-4-ol isoladamente, em concentrações equivalentes à quantidade presente nas concentrações de TTO utilizadas, revelou atuação modulatória sobre INF- γ , IL-4 e IL-17. É possível que outros componentes presentes no TTO possam antagonizar, neutralizar ou interferir na biodisponibilidade do terpinen-4-ol. O alfa-terpineol não exerceu efeito modulatório na produção das citocinas avaliadas após ativação de TLR2 e 4.

Em resumo, o terpinen-4-ol é o componente do óleo de *Melaleuca alternifolia* capaz de influenciar a produção de citocinas relevantes para a modulação da

imunidade adaptativa. Porém, o entendimento de seus efeitos na polarização da resposta das células T deverá ser analisado em estudos *in vitro* utilizando células T, em experimentos de co-cultura de linfócitos e monócitos e também em modelos *in vivo*. O potencial deste componente na modulação da resposta imune pode ter implicações terapêuticas importantes para diversas condições associadas à resposta inflamatória crônica, como as doenças periodontais.

REFERÊNCIAS

1. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:50-62.
2. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105:327-32.
3. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001;91:492-7.
4. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res.* 2000;49:619-26.
5. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33:343-7.

6. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. Minami M. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol.* 2003;47:681-4.
7. Shelton D, Zabarás D, Chohan S, Wyllie G, Baverstock P, Leach D, Henry R. Isolation and partial characterisation of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*. *Plant Physiol Biochem.* 2004;42:875-82.
8. Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res.* 2005;19:643-6.
9. Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, Guillot J. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother Res.* 2006;20:364-70.
10. Brand C, Grimbaldston MA, Gamble JR, Drew J, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. *Inflamm. Res.* 2002;51:236-44.
11. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol.* 2003;38:210-7.
12. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010;89:1349-63.
13. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev.* 2005;208:181-93.

14. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009;80:290-6.
15. Souza JA, Rossa C Jr, Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012;20:128-38.
16. Gurgel BCV, Ribeiro EDP, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Casati MZ. Influência da resposta do hospedeiro e sua modulação na patogênese e terapia periodontal. *Rev Int Periodontia Clin.* 2005; 2:38-44.
17. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32:130-1.
18. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76:2779-83.
19. Medzhitov R. Toll like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2001;1:135-45.
20. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem.* 1995;270:27489-94.
21. Barancík M, Boháčová V, Kvackajová J, Hudecová S, Krizanová O, Breier A. SB203580, a specific inhibitor of p38-MAPK pathway, is a new reversal agent of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur J PharmSci.* 2001;14:29-36.

22. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF- κ B and induces apoptosis of HTLV-I–infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*. 2002;100:1828-34.
23. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:48-54.
24. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: A New Paradigm in Inflammation, Autoimmunity, and Therapy. *J Periodontol*. 2007;78:1083-93.
25. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O’Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003;14:361–8.
26. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol*. 2006;144:35-40.
27. Behfarnia P, Birang R, Andalib AR, Asadi S. Comparative Evaluation of IFN γ , IL4 and IL17 Cytokines in Healthy Gingiva and Moderate to Advanced Chronic Periodontitis. *Dent Res J*. 2010;7:45-50.
28. Yamazaki K, Nakajima T. Antigen specificity and T-cell clonality in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004;35:75-100.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos experimentos realizados e nas informações obtidas temos as seguintes considerações:

- 1 O óleo de *Melaleuca alternifolia*, o terpinen-4-ol e o alfa-terpineol exercem efeito modulador na produção de citocinas por monócitos diferenciados em macrófagos após estímulo de TLR2 e 4.
- 2 O óleo de *Melaleuca alternifolia* é capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, mas não tem influência sobre TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-17. Para citocinas anti-inflamatórias o óleo diminui os níveis de IL-10 e não interfere na IL-4.
- 3 O terpinen-4-ol diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, INF- γ e IL-17, mas não tem influência sobre TNF- α e IL-12. Para citocinas anti-inflamatórias, há diminuição nos níveis de IL-10 e IL-4 quando ativado por *P. gingivalis*.
- 4 O alfa-terpineol diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6, mas não tem influência sobre TNF- α , INF- γ , IL-12 e IL-17. Para citocinas anti-inflamatórias, há diminuição nos níveis de IL-10 e não interfere na IL-4.
- 5 O terpinen-4-ol demonstrou ser o principal componente ativo do óleo de *Melaleuca alternifolia*.
- 6 A atividade modulatória dos óleos sobre as citocinas não se dá pela regulação do NF-kB, ERK e p38 MAP-Kinases.

REFERÊNCIAS*

1. Abe S, Maruyama N, Hayama K, Ishibashi H, Inoue S, Oshima H et al. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential Oils. *Mediators Inflamm*. 2003; 12(6): 323-28.
2. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem*. 1995; 270(46): 27489-94.
3. Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Neto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(2): 221-3.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124(4): 783–801.
5. Asai Y, Ohshima Y, Gen K, Ogawa T. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2001; 69(12): 7387-95.
6. Barancík M, Boháčová V, Kvackajová J, Hudecová S, Krizanová O, Breier A. SB203580, a specific inhibitor of p38-MAPK pathway, is a new reversal agent of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur J Pharm Sci*. 2001; 14(1): 29-36.
7. Barksby HE, Nile CJ, Jaedicke KM, Taylor JJ, Preshaw PM. Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Clin Exp Immunol*. 2009; 156(3): 479-87.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

8. Behfarnia P, Birang R, Andalib AR, and Asadi S. Comparative Evaluation of IFN γ , IL4 and IL17 Cytokines in Healthy Gingiva and Moderate to Advanced Chronic Periodontitis. *Dent Res J*. 2010; 7(2): 45-50.
9. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(2): 169-76.
10. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72(7): 48-54.
11. Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ et al. The water-soluble components of the essential oil of *melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm Res*. 2001; 50(4): 213-19.
12. Brand C, Grimbaldston MA, Gamble JR, Drew J, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. *Inflamm. Res*. 2002; 51(5): 236-44.
13. Brand C, Townley SL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced edema in murine ears. *Inflamm Res*. 2002; 51(6): 283-89.
14. Buduneli N, Ozcaka O, Nalbantsoy A. Salivary and Plasma Levels of Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 in Chronic Periodontitis. *J Periodontol*. 2011; 82(6): 878-84.
15. Cal K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Med*. 2006; 72(4): 311-16.
16. Cal K. How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination kinetics of terpenes? *Arch Dermatol Res*. 2006; 297(7): 311-15.

17. Cal K, Krzyzaniak M. Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. *J Dermatol Sci.* 2006; 42(6): 265-67.
18. Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP et al. Potencial anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytother Res.* 2006; 20(5): 364-70.
19. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 50-62.
20. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(3): 327-32.
21. Chiavaroli A, Dang La V, Orlando G, Menghini L, Epifano F, Grenier D. Rhamnus alpinus Leaf Extract Suppresses Lipopolysaccharide-Induced, Monocyte Derived Macrophage Chemokine Secretion. *Inflammation.* 2008; 31(5): 313-8.
22. Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(3): 492-97.
23. Cross SE, Russell M, Southwell I, Roberts MS. Human skin penetration of the major components of Australian tea tree oil applied in its pure form and as a 20% solution in vitro. *Euro J Pharm Biopharm.* 2008; 69(1): 214-22.
24. Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(3): 233-40.

25. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1998; 69(8): 899-910.
26. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(1): 15-22.
27. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009; 80(2): 290-96.
28. Eskan MA, Rose BG, Benakanakere MR, Zeng Q, Fujioka D, Martin MH et al. TLR4 and S1P receptors cooperate to enhance inflammatory cytokine production in human gingival epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2008; 38(4): 1138-47.
29. Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by γ interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(14): 5238-42.
30. Figueredo CM, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol.* 1999; 70(8): 1457-63.
31. Garfias CRB, Gualito JJM. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet Méx.* 2005; 36(4): 453-68.
32. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003; 38(2): 210-7.

33. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.* 2010; 89(12): 1349-63.
34. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997; 14: 112-43.
35. Giannobile WV. Host-Response Therapeutics for Periodontal Diseases. *J Periodontol.* 2008; 79(8): 1592-1600.
36. Golab M, Sonta KS. Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory Action of Inhaled Tea Tree Oil in Mice. *Exp Biol Med.* 2007; 232(3): 420-26.
37. Gurgel BCV, Ribeiro EDP, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Casati MZ. Influência da resposta do hospedeiro e sua modulação na patogênese e terapia periodontal. *Rev Int Periodontia Clin.* 2005; 2(4): 38-44.
38. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HTA, Levy MW, Beilharz TV, Riley CF et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65(5): 877-88.
39. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(2): 909-15.

40. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*. 2000; 49(11): 619-26.
41. Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, et al. Biological Activities of *Bacteroides forsythus* Lipoproteins and Their Possible Pathological Roles in Periodontal Disease. *Infect Immun*. 2004; 72(3): 1318-25 .
42. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol*. 2006; 144(1): 35-40.
43. Huang ZL, Failla ML, Reeves PG. Differentiation of Human U937 Promonocytic Cells Is Impaired by Moderate Copper Deficiency. *Exp Biol Med*. 2001; 226(3): 222-28.
44. Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology 2000*. 2010; 54(1): 53-70.
45. Keszei A, Hassan Y, J. Foley JW. A Biochemical Interpretation of Terpene Chemotypes in *Melaleuca alternifolia*. *J Chem Ecol*. 2010; 36(6): 652-61.
46. Khalil Z, Pearce AL, Satkunanathan N, Storer E, Finlay-Jones JJ et al. Regulation of wheal and flare by tea tree oil: complementary human and rodent studies. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(4): 683-90.
47. Khalil Z, Pearce AL, Satkunanathan N, Storer E, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(4): 683-90.

48. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(6): 130-1.
49. Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, Van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(3): 145–51.
50. Koh KJ, Earce AL, Marshman G, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br J Dermatol.* 2002; 147(6): 1212–7.
51. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: A New Paradigm in Inflammation, Autoimmunity, and Therapy. *J Periodontol.* 2007; 78(6): 1083-93.
52. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(4): 343-7.
53. Lu YC, Yeh WC, Ohashi OS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008; 42(2): 145-51.
54. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia.* 2009; 80(6): 313-9.
55. Medzhitov R. Toll like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(2): 135-45.

56. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol.* 2003; 47(9): 681-4.
57. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y et al. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF- κ B and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 2002; 100(5): 1828-34.
58. Mullarkey MF, Leiferman KM, Peters MS, Caro I, Roux ER, Hanna RK. Human cutaneous allergic late-phase response is inhibited by soluble IL-1 receptor. *J Immunol.* 1994; 152(4): 2033-41.
59. Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37(2): 185-7.
60. Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal Disease at the Biofilm–Gingival Interface. *J Periodontol.* 2007; 78(10): 1911-25.
61. Overman A, Chuang CC, McIntosh M. Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophageconditioned media. *Int J Obes.* 2011; 35(9): 1165-72.
62. Pearce AL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Reduction of nickel-induced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. *Inflamm Res.* 2005; 54(1): 22-30.

63. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol.* 2012; 3(18): 1-8.
64. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(6): 2779-83.
65. Ryan ME. Clinical applications for host modulatory therapy. *Compend Contin Educ Dent.* 2002; 23(11A): 1071-6,1079-80,1082.
66. Sánchez AL, Sánchez A, Casals C. Surfactant protein A (SP-A)-tacrolimus complexes have a greater anti-inflammatory effect than either SP-A or tacrolimus alone on human macrophage-like U937 cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 77(3): 384-91.
67. Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J Periodontal Res.* 2004; 39(6): 432-41.
68. Shelton D, Zabarás D, Chohan S, Wyllie G, Baverstock P, Leach D et al. Isolation and partial characterisation of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia*. *Plant Physiol Biochem.* 2004; 42(11): 875-82.
69. Shirakawa F, Mizel, SB. In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappaB catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 1989; 9(6): 2424-30.
70. Soukoulis S, Hirsch R. The effects of a tea tree oil-containing gel on plaque and chronic gingivitis. *Aust Dent J.* 2004; 49(2): 78-83.

71. Souza JA, Rossa C Jr, Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(2): 128-38.
72. Sugawara S, Yang S, Iki K, Hatakeyama J, Tamai R, Takeuchi O et al. Monocytic cell activation by nonendotoxic glycoprotein from *Prevotella intermedia* atcc 25611 is mediated by toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2001; 69(8): 4951-7
73. Traboulsi RS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31(3): 272-6.
74. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle P.A. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 1995; 14(12): 2876-83.
75. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev.* 2005; 208: 181-93.
76. Ueki K, Tabeta K, Yoshie H, Yamazaki K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor- α in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127(1): 72-7.
77. Vrana JA, Saunders AM, Chellappan SP, Grant S. Divergent effects of bryostatin 1 and phorbol myristate acetate on cell cycle arrest and maturation in human myelomonocytic leukemia cells (U937). *Differentiation.* 1998; 63(1): 33-42.
78. Wang CZ, Zhang Y, Dong Li X, Hu Y, Fang ZG, Lin DJ et al. PPAR γ Agonist Suppresses TLR4 Expression and TNF- α Production in LPS Stimulated Monocyte Leukemia Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2011; 60(3): 167-72.

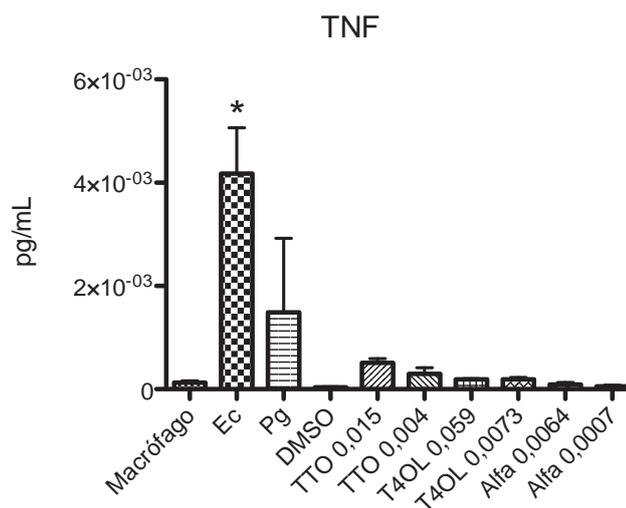
79. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, John J. O'Shea The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14(5): 361–8.
80. Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res.* 2005; 19(7): 643-6.
81. Yamazaki K, Nakajima T. Antigen specificity and T-cell clonality in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 75-100.
82. Yasuda T. Hyaluronan inhibits prostaglandin E₂ production via CD44 in U937 human macrophage. *Tohoku J Exp Med.* 2010; 220(3): 290-35.
83. Yoshioka H, Yoshimura A, Kaneko T, Golenbock TD, Hara Y. Analysis of the Activity to Induce Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Stimulation of Supragingival Plaque. *J Periodontol.* 2008; 79(5): 920-9.

ANEXO 1

1 Avaliação da ação do TTO, terpinen-4-ol e alfa-terpineol na expressão de citocinas na ausência de estímulo com LPS.

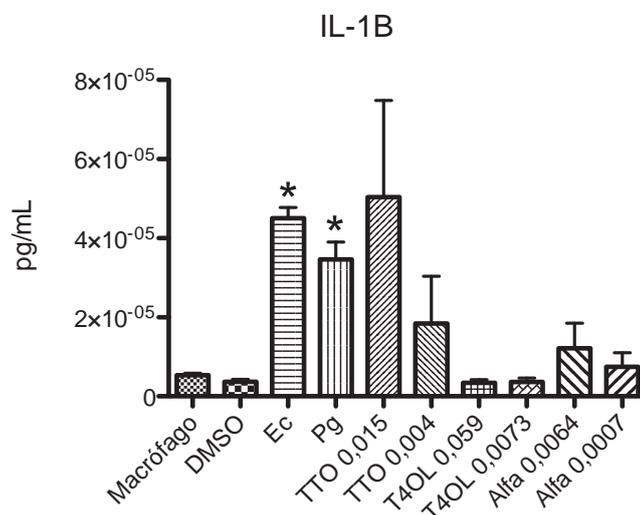
Sem a presença do estímulo com os LPS em cultura de macrófagos não há modificações na produção de TNF- α por estas células (Figura 1).

Figura 1. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, terpinen-4-Ol e alfa-terpineol na secreção de TNF- α (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



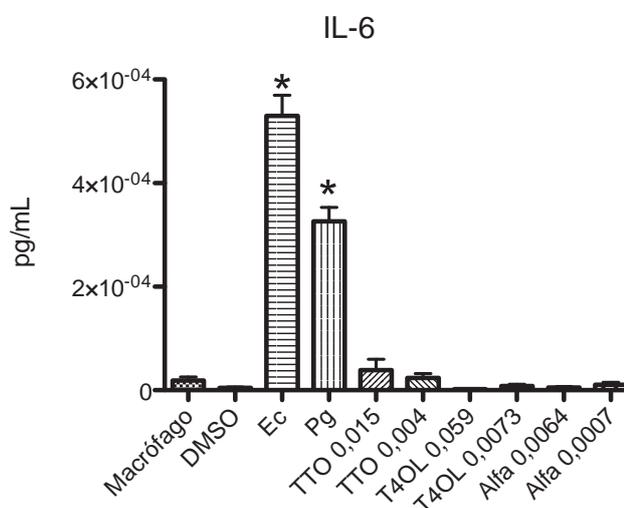
Os óleos sozinhos, sem o LPS, não produziram alterações significativas nos níveis de IL-1 β produzidos por macrófagos. Apesar do TTO 0,015% ter provocado elevação na produção de IL-1 β , esta diferença não foi significativa ao ser comparada com o macrófago (Figura 2).

Figura 2. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de IL-1 β (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



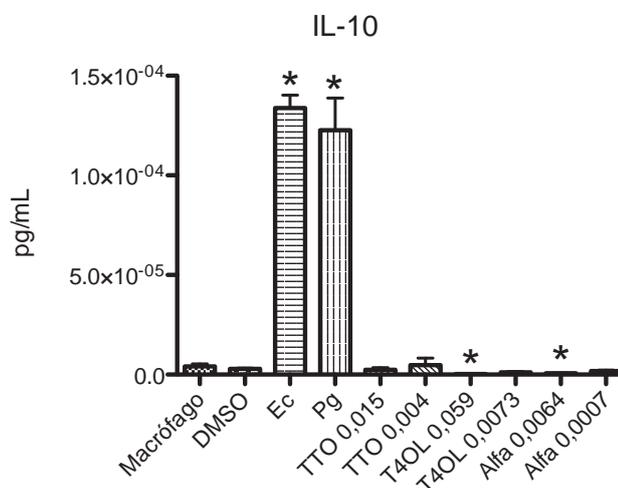
Os óleos sozinhos não induziram alterações nos níveis de IL-6 produzidos por macrófagos (Figura 3).

Figura 3. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de IL-6 (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



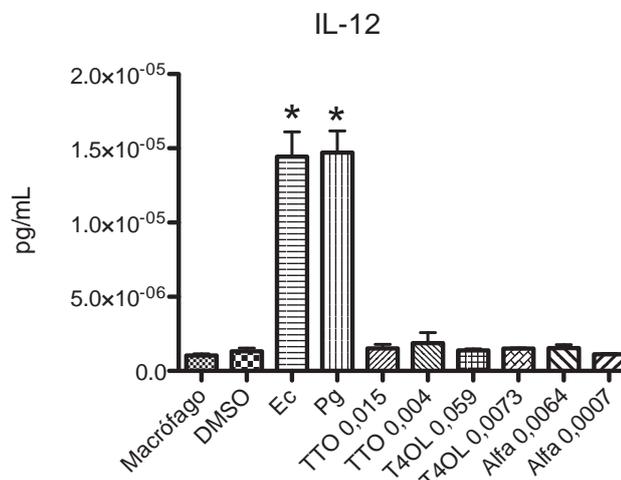
Sem a atuação de um estímulo com LPS de *E. coli* e *P. gingivalis* o terpinen-4-ol 0,059% e alfa-terpineol 0,0064% induziram uma queda significativa na produção de IL-10. As demais concentrações testadas não acarretaram alterações desta citocina nas culturas celulares, na ausência de LPS (Figura 4).

Figura 4. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de IL-10 (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



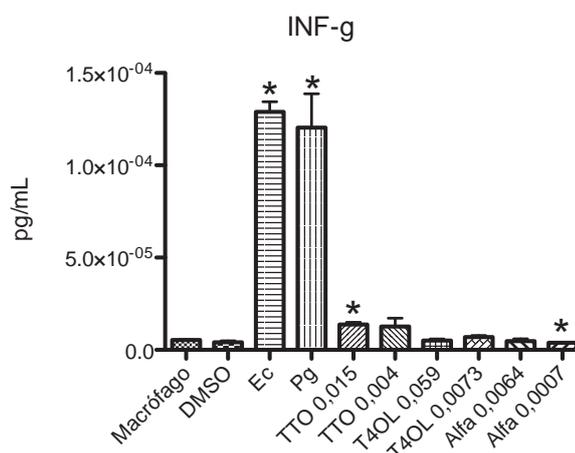
O óleo e seus componentes sozinhos também não ocasionaram alterações na produção de IL-12 (Figura 5).

Figura 5. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de IL-12 (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



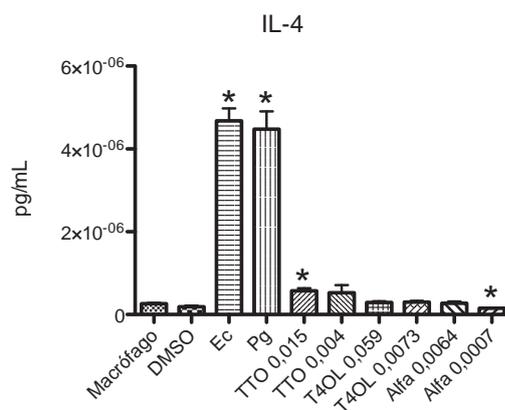
Para o TTO 0,015% observou-se pequeno aumento na produção de de INF- γ . O alfa-terpineol 0,0007% provocou diminuição dos níveis desta citocina, mesmo sem a adição de LPS. Para os demais óleos individualmente, não foi observada alteração nas concentrações desta citocina (Figura 6).

Figura 6. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de INF- γ (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



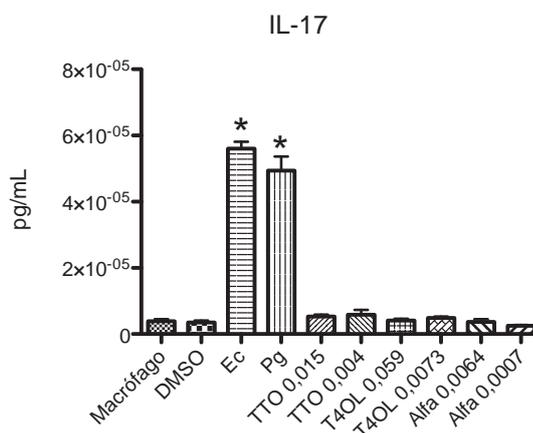
Os níveis de IL-4 foram semelhantes aos de INF- γ quando as células não receberam estímulo de LPS (Figura 7).

Figura 7. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de IL-4 (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



Os óleos não induziram alterações nos níveis de IL-17 na ausência de estímulo com LPS (Figura 8).

Figura 8. Efeito das maiores e menores concentrações do TTO, Terpinen-4-Ol e Alfa-terpineol na secreção de IL-17 (Teste-t comparando o macrófago com os demais $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



ANEXO 2

1 Estudo piloto 1 - Determinação da concentração de PMA utilizada na diferenciação de monócitos em macrófagos.

1.1 Material e Métodos

Os monócitos U937 são células imortalizadas que se apresentam em suspensão e quando estimuladas com PMA adquirem características de macrófagos, aderindo-se no frasco de cultivo. A literatura apresenta diferentes concentrações de PMA por isto a justificativa do estudo piloto ^{43, 64, 66, 77, 78, 82}.

Três concentrações de PMA (10ng/mL, 40ng/mL e 250ng/mL) foram selecionadas e dois tempos de exposição (24 e 48h) foram testados com um período de recuperação de 24h⁶⁶.

Antes da aplicação do PMA, células U937 (25×10^4 cel/mL) foram cultivadas em frascos 182-cm² com 25 mL meio de cultura (RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina) e mantidos a 37° C em 5% CO₂ em ambiente constantemente umidificado durante dois dias.

Adicionou-se diferentes concentrações de PMA aos monócitos (1×10^6 cel/mL) e seguida semeou-se em placa de microtitulação com 24 poços. Os grupos analisados foram:

- a. U937
- b. 10ng/mL por 24h;
- c. 10ng/mL por 24h mais fase de recuperação (sem PMA) de 24h;
- d. 40ng/mL por 24h;
- e. 40ng/mL por 24h mais fase de recuperação (sem PMA) de 24h;

- f. 250ng/mL por 24h;
- g. 250ng/mL por 24h mais 24h de recuperação (sem PMA) de 24h;
- h. 40ng/mL por 48h;
- i. 40ng/mL por 48h mais fase de recuperação (sem PMA) de 24h;
- j. 250ng/mL por 48h;
- k. 250ng/mL por 48h mais fase de recuperação (sem PMA) de 24h.

A viabilidade celular foi avaliada por meio do Azul de Tripán 0,4%, na proporção de 1:1. O controle negativo para o cálculo da viabilidade foi a cultura celular U937 sem PMA. Para soltar as células aderidas, os poços foram lavados duas vezes com PBS e depois adicionado Tripsina 0,25% (GIBCO by Life Technologies), durante 8 minutos. A solução foi então neutralizada com adição, do dobro de volume da tripsina, de RPMI 1640 (10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina).

2 Estudo piloto 2 - Determinação das concentrações dos lipopolissacarídeos utilizados e se a célula não diferenciada (U937) seria mais responsiva ao estímulo do que a diferenciada com PMA (macrófago)

2.2 Material e Métodos

Neste piloto foram utilizadas duas concentrações dos LPS de *P. gingivalis* e *E. coli* nos monócitos e em macrófagos. Tal estudo foi adicionado devido a um questionamento que surgiu ao longo da pesquisa. Se as células monocíticas já estimuladas com o PMA seriam capazes de responder bem a adição do LPS.

Para macrófago as células foram cultivadas e diferenciadas como já descrito. Já, para a célula não diferenciada U937, o protocolo adotado foi de cultivo celular em frascos 182-cm² (25 x 10⁴cel/mL) com 25 mL meio de cultura (RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, 37° C em 5% CO₂) em ambiente constantemente umidificado durante dois dias. Após este período, a concentração de 1 x 10⁶cel/mL foi semeada em placa de microtitulação com 12 poços.

Em seguida, procedeu-se o estímulo das células com LPS *P. gingivalis* (100ng/mL e 1µg/mL) e *E. coli* (1µg/mL e 10µg/mL) nos tempos de 2, 6 e 24horas.

Ao final destes períodos, para os monócitos o meio foi coletado centrifugado 1.500 rpm por 5 minutos e o pellet lavado com PBS para depois adicionar o tampão de extração de RNA. Para os macrófagos, o meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com solução salina fosfatada tamponada (PBS pH 7,4) e coletadas em tampão de extração do kit RNAqueous®-4PCR (Applied Biosystems) empregado no isolamento do RNA total, seguindo as recomendações do fabricante.

A quantidade e a pureza do RNA foram verificadas por espectrofotometria (Nanovue GE Helthcare Live Sciences) e foi utilizada apenas as amostras que apresentaram relação A260/A280 entre 1.8 e 2.0. Um total de 100 ng de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems) de acordo com o manual do fabricante.

O cDNA foi utilizado para determinação da quantidade relativa de RNAm dos genes-alvo em reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção TaqMan e pares de primers e sondas pré-desenhados e otimizados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) para TNF-α (Hs00174128), IL-8 (Hs00174103). A avaliação da regulação da expressão gênica foi feita após

normalização dos resultados para a expressão de gene constitutivo não modulado pelas condições experimentais (GAPDH Hs02758991) de forma comparativa pelo método $\Delta(\Delta Ct)$ utilizando o software de controle da termocicladora (StepOne Plus, Applied Biosystems).

3 Estudo piloto 3 - Determinar o tempo de exposição do LPS para avaliação da ativação das vias de sinalização

3.1 Material e Métodos

Culturas de macrófagos (1.0×10^6 cel/mL, 37°C, 5% CO₂) foram cultivadas em placas de 60cm² com RPMI-1640, com 1% de soro fetal bovino, sem penicilina-estreptomicina. Posteriormente, adicionou-se o LPS de *P. gingivalis* e LPS de *E. coli* por 10, 30 e 60 minutos. O anticorpo primário monoclonais utilizado foi Phospho-Mek 1/2 (Cell Signaling). O grupo controle foi o macrófago sem LPS. Ao final do período experimental o protocolo adotado foi o mesmo descrito em materiais e métodos para Western Blot.

ANEXO 3

1 Resultado da análise dos componentes do óleo de *Melaleuca*

Para a obtenção dos valores dos componentes do óleo e verificação da compatibilidade com a ISO 4730 optou-se pela cromatografia, realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (USP) com a colaboração Prof. Dr. Paulo Jorge M. Cordeiro. Os valores percentuais para terpinen-4-ol e alfa-terpineol foram respectivamente: 47.66% e 5.13%. A Tabela 1 demonstra as proporções dos componentes do óleo de *Melaleuca* segundo a ISO 4730. Pode-se observar que os valores obtidos na cromatografia do óleo utilizado na pesquisa estão dentro dos padrões.

Tabela 1. Composição do óleo de *Melaleuca* segundo os padrões ISO 4730 em comparação com os dados obtidos na cromatografia do óleo utilizado na pesquisa. Tabela adaptada de Carson et al., (2006)*. Araraquara, 2013.

Componente	Composição (%)	
	ISO 4730 ^a	Composição do óleo da SIGMA
Terpinen-4-ol	≥30 ^b	47,66
γ-Terpineno	10-28	23,58
α-Terpineno	5-13	6,45
1,8-Cineole	≤15 ^c	1,05
Terpinoleno	1,5-5	3,56
ρ-Cymene	0,5-12	2,58
α-Pinene	1-6	2,83
α-Terpineol	1,5-8	5,13
Limoneno	0,5-4	1,0

a ISO 4730, Organização Internacional para Padronização.

b Nenhum limite superior está definido, embora 48% sejam propostos.

c Nenhum limite inferior está definido.

***Fonte:** Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1): 50-62.

Segundo de Hart et al.⁴⁰ (2000) a atividade anti-inflamatória do TTO encontrada foi nas concentrações de 0,125% e 0,062%. Baseados nestes valores e nos percentuais da cromatografia foram estipulados os valores para terpinen-4-ol e alfa-terpineol. O presente trabalho adotou as seguintes concentrações apresentadas na Tabela 2.

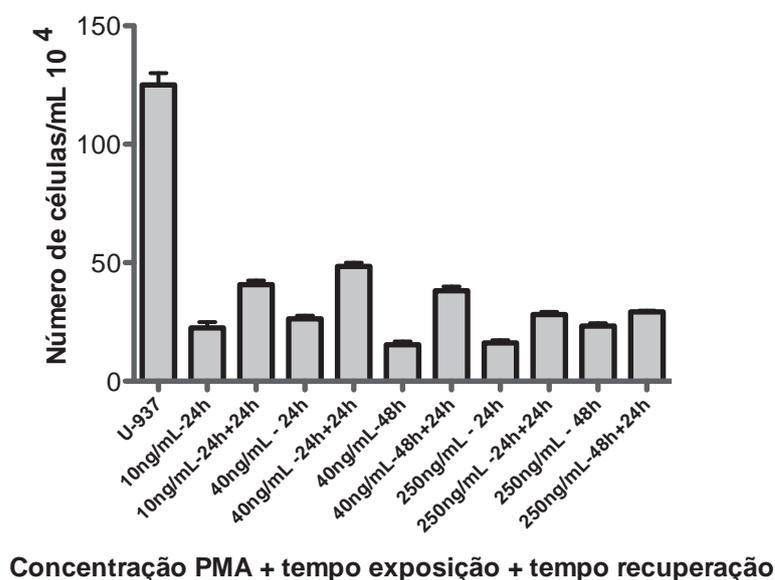
Tabela 2. Concentrações das porções do TTO para a execução dos experimentos. Araarquara, 2013.

Componente	Concentração (%)					
TTO	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0.015
Terpinen-4-ol	0.288	0.119	0.059	0.029	0.014	0.0073
α -Terpineol	0.0256	0.0128	0.0064	0.0031	0.0015	0.0007

2 Resultado do estudo piloto 1

A concentração de PMA 40ng/mL por 24h com troca de meio em 24h foi a que apresentou maior número de células viáveis pelo Azul de Tripán (Figura 1). Por isto ela foi adotada como concentração de PMA e tempo de exposição para diferenciação de monócitos U937 em macrófagos.

Figura 1. Número de células/mL x Concentrações de PMA analisado por meio do teste de Azul de Tripán. Araraquara, 2013.

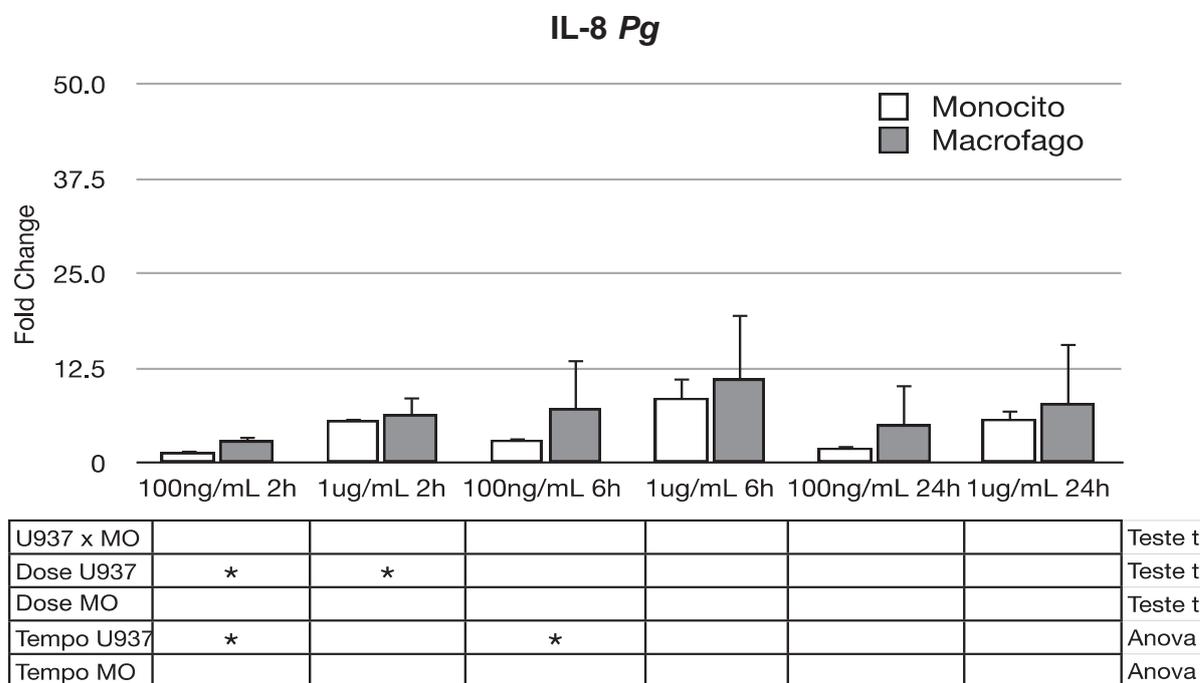


3 Resultado do estudo piloto 2

Para o estímulo com LPS de *E. coli*, a produção de mRNA de TNF- α pelos macrófagos foi mais responsiva do que os monócitos. O fator tempo foi determinante para o estímulo de 24h, o qual produziu menor expressão de mRNA (Figura 2).

A expressão de TNF- α para a concentração do LPS (*P. gingivalis*) em 1 μ g/mL produziu um maior estímulo em 2h de exposição do que 100ng/mL em monócitos (Figura 3). Apesar de a diferença não ter sido significativa para a concentração do LPS para macrófago, visivelmente células estimuladas com 1 μ g/mL expressaram maiores concentrações de mRNA para TNF- α que as demais. Assim a concentração de 1 μ g/mL foi escolhida para estímulo com LPS de *P. gingivalis* (Figura 3). Para *E. coli*, como não houve diferença significativa entre as doses, a concentração utilizada foi de 1 μ g/mL (Figura 2).

Figura 5. Quantificação do mRNA de IL-8 por PCR em tempo real, o controle endógeno foi GAPDH. Diferença significativa indicada pelo asterisco (Teste-t e ANOVA one way $p < 0,05$). Araraquara, 2013.



4 Resultado do estudo piloto 3

O estímulo por 10 minutos com LPS de *E. coli* foi suficiente para induzir via de sinalização celular (Figura 6).

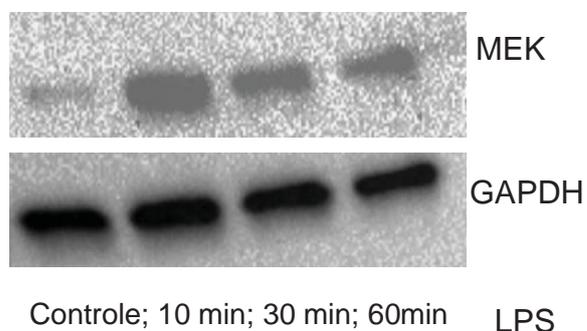


Figura 6. Análise de Western blot com diferentes tempos de estímulo com LPS de *E. coli* para o anticorpo MEK (45kDa). Normalização com GAPDH (37kDa). Araraquara, 2013.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 28 de Março de 2013
Marianne Nicole Marques Nogueira