

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Bruno Ramos Lima

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS
POR MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM
LIPOPOLISSACARÍDEOS DE *P. GINGIVALIS***

Belo Horizonte

2014

Bruno Ramos Lima

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS
POR MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM
LIPOPOLISSACARÍDEOS DE *P. GINGIVALIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

L732e Lima, Bruno Ramos
Efeito do ácido hialurônico na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados com lipopolissacarídeos de *p. gingivalis* / Bruno Ramos Lima. Belo Horizonte, 2014.
53 f. : il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Ácido hialurônico. 2. Citocinas. 3. Monócitos. 4. Matriz Extracelular. 5. Doença periodontal. 6. Gengivite. Souza, Paulo Eduardo Alencar. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Bruno Ramos Lima

EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEOS DE *P. GINGIVALIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Profa. Dra. Paula Rocha Moreira – UFMG
- 2- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 30 de julho de 2014

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 18 de agosto de 2014

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um componente da matriz extracelular que tem sido utilizado no tratamento de inflamações articulares e da doença periodontal. Estudos têm mostrado que o AH é capaz de modular a resposta inflamatória, induzir angiogênese, quimiotaxia, diferenciação celular e reparo tecidual, além de possuir atividade bacteriostática. Como o AH é clinicamente aplicado diretamente nos tecidos ósseo, gengival e do ligamento periodontal, sua utilização pode afetar os mecanismos imunoinflamatórios nesses tecidos, os quais participam do controle do processo de reparo e são responsáveis pela manutenção da homeostase periodontal. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do AH na produção de citocinas por monócitos estimulados *in vitro* por lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Células mononucleares de sangue periférico de nove indivíduos saudáveis foram estimuladas com LPS de *P. gingivalis* e em seguida incubadas com AH. A produção das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-12, bem como a expressão do receptor de IL-10 (IL-10R), foram quantificadas por meio de reações de imunofluorescência e análise por citometria de fluxo. O teste ANOVA um critério com repetição seguido do teste *post hoc* de Bonferroni foram utilizados com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a incubação com AH, embora não tenha afetado as frequências de monócitos produtores das citocinas avaliadas, aumentou a frequência de monócitos expressando IL-10R quando comparado ao grupo estimulado apenas com LPS. Nossos dados sugerem que AH pode desempenhar funções de modulação da resposta imunoinflamatória estimulada por LPS de periodontopatógeno por meio da estimulação da expressão do receptor de IL-10 em monócitos.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Citocinas. Lipopolissacarídeo. *Porphyromonas gingivalis*. Monócitos.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a component of the extracellular matrix that has been used to treat joint inflammation and periodontal disease. Studies have shown that HA can modulate inflammatory responses, inducing angiogenesis, chemotaxis, cell differentiation and tissue repair as well as having bacteriostatic activity. As HA is clinically applied directly to bone tissue, gingival and periodontal ligament, its use can affect the immunoinflammatory mechanisms in these tissues, which participate in the control of the repair process and are responsible for maintenance of periodontal homeostasis. The objective of this study was to evaluate the effect of HA on cytokine production by monocytes stimulated in vitro by lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis*. Mononuclear cells from peripheral blood of nine healthy individuals were stimulated with LPS of *P. gingivalis* and then incubated with HA. The production of IL-1 α , IL-6, IL-10 and IL-12 as well as the expression of IL-10 receptor (IL-10R) were quantified by immunofluorescence reactions and analysis by flow cytometry. The ANOVA one way repeat followed by a post hoc Bonferroni test were used with a significance level of 5%. The results showed that incubation with HA, although it has not affected the frequencies of monocytes producing the cytokines evaluated, increased frequency of monocytes expressing IL-10R compared to the group stimulated only with LPS. Our data suggest that HA could perform functions of modulation of immunoinflammatory response stimulated by LPS periodontopathogen through stimulation of the expression of the IL-10 receptor on monocytes.

Keywords: Hyaluronic acid. Cytokines. Lipopolysaccharide. *Porphyromonas gingivalis*. Monocytes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao professor Paulo Eduardo Alencar de Souza pela paciência e ajuda.

Aos colegas de turma pela experiência e companheirismo durante esses dois anos.

Aos familiares e amigos pelo apoio e compreensão.

Gostaria de agradecer à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À Professora Walderez Ornelas Dutra e aos alunos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB/UFMG, especialmente à doutoranda Luisa Magalhães, por todo o apoio e orientação nos experimentos.

À aluna de iniciação científica Isabella Coelho pela ajuda durante o trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Ácido Hialurônico

HMWHA – Ácido Hialurônico de alto peso molecular

LMWHA – Ácido Hialurônico de baixo peso molecular

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-alfa

IFN- γ – Interferon-gama

M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

VEGF – Fator de Crescimento do Endotelial Vascular

NO – Óxido Nítrico

MMPs – Metaloproteinases de Matriz

SOCS – Supressores de Sinalização de Citocinas

LPS – Lipopolissacarídeo

RHAMM – Receptor de Motilidade de AH

TLR4 – Receptor tipo Toll-4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Acido Hialurônico.....	16
1.2 Utilizações clínicas do ácido hialurônico.....	19
1.3 Papel das citocinas nos processos imunoinflamatórios periodontais	21
1.4 Participação do ácido hialurônico nos processos imunoinflamatórios.....	26
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 ARTIGO	31
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear da matriz extracelular do tecido conjuntivo presente nas mucosas, tecidos periodontais mineralizados e não mineralizados e muitos outros órgãos do corpo. Por ser um componente importante da matriz extracelular e contribuir significativamente para a hidrodinâmica dos tecidos através de sua influência nos processos de migração e proliferação celular, o AH participa ativamente da dinâmica de reparo de feridas (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010; TAMARI et al., 2011).

Ao se ligar em diferentes receptores celulares, o AH regula vários processos biológicos, incluindo osteocondução, reparo de feridas, inflamação e invasão tumoral (TANAKA et al, 2011). Devido à sua ação estimuladora do reparo tecidual, o AH está sendo utilizado em tratamentos periodontais, como raspagem e alisamento radicular, cirurgias mucogengivais e na reparação alveolar e reparação de defeitos ósseos.

Tem sido sugerido que o AH pode ter um efeito benéfico no tratamento da gengivite induzida por placa, na manutenção da saúde peri-implantar e de tecidos em regeneração óssea (GALLI et al, 2008). O HA tem mostrado efeitos anti-inflamatório e antibacteriano, além da capacidade de reduzir o edema em tratamentos de gengivite e periodontite. Tem sido sugerido que o efeito anti-inflamatório pode ser devido à ação exógena do AH, reduzindo a biodisponibilidade de prostaglandinas, metaloproteinases e outras moléculas bio-ativas presentes no meio extracelular (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

O contato direto do ácido hialurônico com os tecidos ósseo e conjuntivo fibroso do periodonto pode causar alterações nos processos celulares periodontais, os quais mantêm a integridade tecidual e o combate aos produtos microbianos provenientes do sulco gengival por meio da ação de células inflamatórias (LINDHE; KARRING; LANG, 2005). Como as citocinas são responsáveis pelo controle das funções celulares dos leucócitos, alterações quantitativas e qualitativas na produção das mesmas podem causar um desequilíbrio na resposta imunoinflamatória periodontal protetora, afetando o combate aos microorganismos e a preservação da integridade tecidual (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

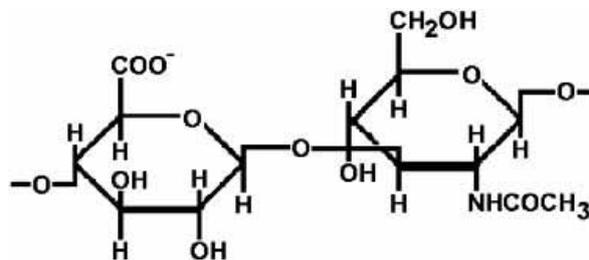
O estudo do efeito do AH na produção de citocinas por células imunocompetentes estimuladas por produtos de periodontopatógenos pode contribuir para a melhor compreensão sobre sua ação no tratamento da doença periodontal.

1.1 Acido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) foi descoberto em 1934 por Karl Meyer e seu colega John Palmer, cientistas da Universidade de Columbia, New York, que isolaram uma substância química a partir do humor vítreo de olhos de vaca. Eles propuseram o nome ácido hialurônico, porque foi derivado da palavra grega hyalos (vidro), e continha duas moléculas de açúcar, uma das quais o ácido urônico (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

O HA é um polissacárido natural linear, de alta massa molecular composto por alternadas ligações de (1→4)-β ligados ao D-glucurônico (GlcA) e (1→3)-β ligados ao N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). A estrutura química do HA é bastante regular. A única divergência é a possível substituição de GlcNAc com resíduos de glucosamina desacetilada (VOLPI et al., 2009). Suas moléculas podem ser de alto peso molecular (3000-4000 kDa) ou de baixo peso molecular (20 kDa) (SADOWITS et al., 2012).

Figura 1: Estrutura básica do ácido hialurônico



Fonte: SADOWITS et al., 2012

O AH pertence a um grupo de substâncias conhecidas como glicosaminoglicanas (GAGs), que compreendem também o sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratano, heparano e sulfato de heparina. O AH é o único GAG não sulfatado e o único não sintetizado no aparelho de Golgi (VOLPI et al., 2009). O AH é sintetizado na superfície interna da membrana plasmática como um polímero linear livre (SADOWITS et al., 2012). Está presente na matriz extracelular do tecido conjuntivo, do fluido sinovial, mesênquima embrionário, humor vítreo, pele e muitos outros órgãos e tecidos do corpo, e desempenha um papel vital no funcionamento de matrizes extracelulares (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

O AH ocorre principalmente nas matrizes extracelulares, embora, recentemente, tenha sido demonstrado que também pode estar presente no meio intracelular. Dentro da maioria dos tecidos moles e duros, tais como na matriz da cartilagem articular, o AH está associado a uma proteína de ligação com um proteoglicano (PG), agrecano, que consiste de GAGs. Os agregados AH-agrecano têm enormes massas molares de até 100 MDa, incorporados dentro de uma estrutura de colágeno (VOLPI et al., 2009). O HA normalmente é encontrado em altas concentrações nos tecidos em que ocorrem rápida regeneração e proliferação celular, principalmente, durante a embriogênese e nas feridas cicatriciais. Também está envolvido na transdução de sinais celulares e na motilidade celular, sendo associado aos processos de invasão de células neoplásicas e formação de metástases (VOLPI et al., 2009).

Diversas células possuem receptores de superfície específicos para o AH, sendo o CD44 o mais importante, além de outros receptores de superfície como o RHAMM (receptor de AH de motilidade), o LYVE-1 (endotélio linfático) e o HARE (envolvido com a endocitose) (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

Através de suas complexas interações com componentes da matriz e células, o AH desempenha múltiplos papéis biológicos, tanto por suas propriedades físico-químicas, quanto biológicas. Esses papéis biológicos variam de uma função puramente estrutural na matriz extracelular até a regulação gênica por meio da ligação a receptores celulares. Em termos físico-químicos, sua propriedade viscoelástica pode retardar a penetração de vírus e bactérias. Apresenta também efeitos de estimulação da migração, proliferação e diferenciação celular, ação angiogênica e bacteriostática, além de potencial osteocondutor (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

A concentração de ácido hialurônico (HA) livre no tecido é relativamente baixa. No entanto, níveis de AH são drasticamente elevados imediatamente após a lesão tecidual (ASLAN; SIMSEK; DAYI, 2006). Durante o processo inflamatório e na reparação tecidual, o AH se une a rede de fibrinas e ativa células inflamatórias como macrófagos, estimulando-os a migrar e destruir patógenos. Estimula também a produção de citocinas por queratinócitos, ameloblastos, fibroblastos e osteoblastos, as quais podem promover a inflamação. Mais tardiamente no processo inflamatório, o AH é degradado pela enzima hialuronidase, para produzir moléculas de AH de baixo peso molecular, as quais promovem a angiogênese (BRIGUGLIO et al., 2013).

Embora participe da indução da inflamação por estimular células teciduais, o AH também apresenta efeito anti-inflamatório, provavelmente devido à sua capacidade de reduzir a biodisponibilidade de mediadores inflamatórios e enzimas secretados na matriz extracelular, por meio de interações moleculares (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

O AH exibe propriedades antioxidantes e é capaz de modular a cicatrização de feridas, por meio do estímulo à migração e proliferação de células e pelo aumento da hidratação tecidual. No entanto, estes efeitos dependem, em parte, do tamanho molecular do AH (FERGUSON et al., 2011).

Uma das funções mais importantes do AH é a regulação da homeostase da água nos tecidos, servindo como barreira à difusão de macromoléculas, modulando assim as funções celulares, como adesão e divisão celular (PISTORIUS et al., 2005).

Outra propriedade interessante do AH é que a sua estrutura molecular pode ser montada em vários pesos moleculares (GALLI et al., 2008). De acordo com Campos et al. (2012), formas de alto e de baixo peso molecular de AH apresentam efeitos opostos sobre o comportamento das células. AH de peso molecular elevado é capaz de inibir a atividade fagocítica de macrófagos, ao passo que AH de baixo peso molecular é conhecido por estimular esta atividade. HMWHA (AH de alto peso molecular) extracelular inibe o crescimento de células endoteliais e é, por conseguinte, de natureza anti-angiogênica. Estudo *in vitro* realizado por Maharjan, Pilling e Gomer (2011) mostraram que HMWHA promove a diferenciação fibroblástica, enquanto LMWHA (AH de baixo peso molecular) inibe esse processo.

Polímeros de AH têm uma notável capacidade para se ligar ao fibrinogênio e, assim, desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas. Além disso, eles estimulam a síntese de colágeno dos tipos I e VIII, que são moléculas da matriz extracelular associadas a células endoteliais angiogênicas (CAMPOS et al., 2012).

O AH parece ser promissor nos procedimentos cirúrgicos para reparo ósseo, por apresentar diversas propriedades importantes para os processos envolvidos no reparo tecidual, como indução de angiogênese, controle do processo inflamatório, atividade osteocondutiva, atividade bacteriostática e estimulação da diferenciação de células mesenquimais (MENDES et al., 2008). Além disso, é de fácil aplicação. Diferentes estudos têm avaliado a associação de ácido hialurônico com enxertos ósseos, matriz de osso desmineralizado e cerâmicas de hidroxiapatita para

preenchimento de defeitos ósseos (ASLAN; SIMSEK; DAYI, 2006; BAKOS; SOLDAN; HERNANDEZ-FUENTES, 1999; COLNOT et al., 2005).

1.2 Utilizações clínicas do ácido hialurônico

A utilização de AH no tratamento de doenças inflamatórias já esta bem estabelecida em áreas médicas tais como ortopedia, dermatologia e oftalmologia. Tem sido usada em radioepitelite, osteoartrite do joelho, artrite reumatóide e cirurgia de catarata (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010).

Estudos clínicos têm mostrado que aplicação tópica de AH promove o reparo da mucosa nasal após cirurgia. Também tem sido demonstrado ser eficaz para reduzir a incidência de radioepitelite em pacientes que tenham sofrido radioterapia na cabeça e pescoço, mama ou carcinomas pélvicos (NOLAN et al., 2006). O AH tem sido também utilizado em procedimentos cirúrgicos dentro do olho e na superfície do olho para evitar secura e tem sido utilizado no preparo de lágrimas artificiais para pacientes com olhos secos (PARK et al., 2010).

Segundo Bansal, Kedige e Anand (2010), o uso de ácido hialurônico a 0,8%, após o debridamento mecânico de feridas, tem gerado grandes benefícios clínicos em termos de cura após tratamento não cirúrgico.

Foi relatado em um estudo recente sobre a cicatrização de feridas na pele de ratos, que a expressão de AH apresenta pico em sete dias e que este estimula a proliferação e migração de queratinócitos, sugerindo papel do AH no processo de reepitelização de feridas (TAMARI et al., 2011).

O ácido hialurônico tem sido usado em Odontologia, na cicatrização de feridas, tratamento de gengivite e periodontite, tratamento de mucosite e periimplantite, tratamento de lesões aftosas, em disfunções da articulação temporomandibular, tratamento de candidíase, regeneração alveolar após extração e na cirurgia de implantes (ASLAN; SIMSEK; DAYI, 2006; NOBRE; CARVALHO; MALO, 2009; NOLAN et al., 2006; PARK et al., 2010; PISTORIUS et al., 2005; TAMARI et al., 2011). A presença de AH na saliva humana tem sido relatada e pode contribuir para a lubrificação, auxiliando na proteção da mucosa oral. Devido à sua propriedade viscoelástica e não imunogênica, o AH pode ser considerado uma molécula candidata para substitutos da saliva de pacientes com xerostomia (PARK et al., 2010).

O AH tem sido utilizado para tratamento de doenças periodontais. As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos que colonizam a superfície dentária supra ou subgingivalmente. Podem acometer o tecido de forma mais branda ou inicialmente (gingivite), envolvendo somente a gengiva, ou podem acometer o tecido periodontal de suporte como osso alveolar e ligamento periodontal (periodontite). O AH tem apresentado efeitos benéficos ao tratamento de doenças periodontais.

Pistorius et al. (2005) demonstram que o potencial anti-inflamatório e reparador de AH aplicado de forma exógena leva a uma melhora significativa dos parâmetros clínicos inflamatórios no tratamento da gingivite.

Karim et al. (2012) realizaram um estudo com 14 pacientes, que apresentavam defeitos ósseos periodontais de pelo menos 5 mm em pares de pré-molares ou molares, sendo um o grupo teste e o outro o grupo controle. No grupo teste foi aplicado um gel de AH de 0,5 ml a 0,8% (Gengigel, Ricerfarma, Milan, Italy), enquanto o grupo controle foi aplicado um placebo. Os grupos foram avaliados logo após a cirurgia, 3 e 6 meses após a cirurgia. Os parâmetros utilizados foram nível de inserção clínica, profundidade da bolsa, recessão gengival, índice de sangramento e índice de placa. Após avaliação de todos os dados, observou-se uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos teste e controle após 3 e 6 meses, onde o grupo teste apresentou maior ganho de nível de inserção clínica e redução da recessão gengival. Os outros fatores não apresentaram diferença estatística significativa, porém os dois grupos apresentaram resultados positivos em todos os parâmetros.

Pilloni et al. (2011) avaliaram a eficácia de um biogel a base de ácido hialurônico nos parâmetros clínicos na doença periodontal. O estudo contou com 19 pessoas, que apresentavam duas bolsas periodontais menores de 4 mm, sendo uma o grupo teste com ácido hialurônico e o outro o grupo controle. Foram avaliados sangramento à sondagem, redução de profundidade à sondagem, redução do índice de placa e ganho de inserção à sondagem. Os pacientes foram devidamente instruídos sobre a higienização diária e avaliados após 7, 14 e 21 dias. Todos os fatores avaliados tiveram maior eficácia no grupo tratado com ácido hialurônico em todas as consultas, e os pacientes não apresentaram nenhuma reação adversa ao AH. Assim, foi possível concluir que o tratamento com AH reduz a inflamação gengival e melhora os parâmetros clínicos periodontais.

Uma interessante aplicação do AH, mas ainda em fase experimental, é no reparo de alvéolos pós-extração. Um estudo piloto de boca dividida com oito coelhos mostrou maior formação óssea nas fases iniciais em alvéolos preenchidos com gel de AH a 0,8% em comparação com o grupo controle, preenchido apenas por coágulo (GALLI et al., 2008). Mendes et al. (2008) também mostraram aceleração do reparo ósseo em alvéolos de ratos preenchidos com gel de ácido hialurônico.

Um estudo experimental, em fêmures de ratos, mostrou que o AH de alto peso molecular foi capaz de acelerar a formação de novo tecido ósseo por meio da diferenciação das células mesenquimais nas feridas ósseas, possivelmente por sua capacidade de manter fatores de crescimento na matriz, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), nos locais de reparo ósseo (SASAKI; WATANABE, 1995).

O AH é biocompatível e seguro de se utilizar por meio de géis, injeções ou por via oral. Em alguns pacientes, podem ocorrer efeitos adversos ou colaterais do AH, como equimose, edema, eritema, prurido, dor e sensibilidade no local da injeção na pele, embora de gravidade reduzida (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Galli et al. (2008) não relataram efeitos adversos ao se aplicar 0,2mL de gel de AH de alto peso molecular a 0,8% sobre feridas incisadas e suturadas na mucosa bucal de pacientes.

Em um estudo *in vitro* realizado por Bogovic et al. (2011) para comparar a biocompatibilidade do AH com adesivo dentinário e hidróxido de cálcio no capeamento pulpar, foi mostrado que a cultura celular tratada com AH apresentou maior número de odontoblastos e fibroblastos do que a cultura controle, o que indica um grande potencial deste material para a criação de dentina reparadora.

1.3 Papel das citocinas nos processos imunoinflamatórios periodontais

A inflamação é um processo complexo caracterizado pela alteração da microcirculação que possibilita o extravasamento de plasma e a diapedese de leucócitos nos tecidos conjuntivos vascularizados (BRASILEIRO-FILHO, 2009). No sítio inflamatório, as células imunocompetentes desempenham suas atividades biológicas, que são dependentes da comunicação intercelular mediada principalmente pelas citocinas. Os macrófagos são células já presentes nos tecidos e sua ativação por meio do reconhecimento de produtos microbianos leva à

secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, responsáveis por fenômenos vasculares e celulares (WELLS; RAVASI; HUME, 2005; FUJIWARA; KOAYASHI, 2005; KOPF; BACHMANN; MARSLAND, 2010). Em sítios de infecção bacteriana, produtos como os lipopolissacarídeos, ativam macrófagos estimulando a capacidade fagocitária e microbicida, por meio da geração de intermediários reativos derivados do oxigênio (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

As citocinas são polipeptídeos secretados em resposta a agentes agressores, que participam da comunicação celular no sítio inflamatório, estando envolvidas na multiplicação, ativação, inibição, recrutamento e morte celular (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Possuem ações pleiotrópicas ou redundantes e podem apresentar características pró- ou anti-inflamatórias.

Interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) são importantes mediadores da inflamação, por induzirem alterações no endotélio vascular, estimular o recrutamento leucocitário e os mecanismos efetores da imunidade celular (ROMAGNANI, 2002). As citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) são produzidos por macrófagos e estimulam a osteoclastogênese e conseqüente reabsorção óssea (ATHANASOU, 1996; BERTOLINI et al., 1986). Por outro lado, TNF- α , IL-1 e IL-6 também são responsáveis por desencadear a osteogênese (THOMAS; PULEO, 2011).

IL-1 e TNF- α exibem uma resposta bifásica em lesões ósseas. Apresentam-se em níveis elevados imediatamente após a ocorrência de agressão tecidual, porém, tornam-se indetectáveis no espaço de 72 horas. Em cerca de 3 a 4 semanas após a lesão, ambas apresentam picos que podem corresponder a fases iniciais do processo de remodelação óssea (KON et al., 2001). TNF- α e IL-1 também apresentam capacidade de inibir a síntese de colágeno (HARRISON et al., 1998; HOROWITZ; KACENA; LORENZO, 2005). TNF- α atua no processo de migração de células em vários níveis, como indução da regulação de moléculas de adesão e estimulação da produção de quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas envolvidas na migração de células para locais de inflamação (PESCHON et al., 1998; DINARELLO, 2000; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003; KINDLE et al., 2006). IL-6 atua na promoção da diferenciação de osteoblastos e osteoclastos, na estimulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e na

promoção da mineralização e maturação do tecido ósseo neoformado (HOROWITZ; KACENA; LORENZO, 2005; YANG et al., 2007).

IL-12 é produzida principalmente por macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B em resposta a produtos bacterianos e parasitas intracelulares (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2010). Atua estimulando a diferenciação de linfócitos T virgens no subtipo Th1, os quais são determinantes na resistência e combate a microrganismos intracelulares (YUN et al., 2001). IL-12 também estimula a produção de interferon gama (IFN- γ) e TNF- α por células NK e linfócitos T auxiliares (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2010). A secreção de IFN- γ induzida por IL-12 aumenta a fagocitose e a produção de óxido nítrico (NO), potencializando a destruição de patógenos (TRINCHIERI; GEROSA, 1996). IL-12 também tem sido descrita como um supressor de citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-10 (TRINCHIERI; PFLANZ; KASTELEIN, 2003). Devido ao seu papel na resposta imune, a IL-12 tem sido implicada no desenvolvimento de várias doenças, incluindo doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide (HUEBER et al., 2010), psoríase (GLOWACKA et al., 2010) e doenças bucais como periodontite (SASAKI et al., 2008).

Diferentemente da via destrutiva que envolve as citocinas pró-inflamatórias, as vias reguladoras mediadas por citocinas anti-inflamatórias podem controlar ou atenuar o desenvolvimento da inflamação. IL-10 interfere diretamente na produção de IFN- γ por linfócitos T, demonstrando importante função como citocina imunorreguladora (JOVANOVIC et al., 1998; NAUNDORF et al., 2009). Também inibe a atividade de células NK, reduzindo a expressão de IFN- γ e TNF- α , e a atividade de macrófagos, por reduzir a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (COMMINS; STEINKE; BORISH, 2008; COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). IL-10 também inibe a expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 por células dendríticas e outras células apresentadoras de antígeno profissionais, reduzindo a emissão de co-estímulos essenciais à ativação e diferenciação de linfócitos T (COMMINS; STEINKE; BORISH, 2008; COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). Por outro lado, tem sido demonstrado que IL-10 também possui indiretamente efeitos pró-inflamatórios, por meio da ativação da proliferação de linfócitos B e estimulação da secreção de imunoglobulinas (LARCHE, 2007; MAYNARD; WEAVER, 2008).

As proporções de citocinas produzidas pelas células do infiltrado inflamatório determinam os efeitos biológicos nos sítios de infecção, como o combate aos antígenos e microorganismos e a destruição tecidual (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Na doença periodontal, a resposta imune inflamatória é responsável pelo maior dano causado aos tecidos periodontais, gerando as alterações patológicas que caracterizam as manifestações clínicas da doença (PHILIP; JOHN, 2011). A importância das citocinas na patogênese da doença periodontal é evidente em vários estudos. Elas não só atuam como iniciadoras e reguladoras da imunidade inata e adaptativa, mas também ativam mecanismos que causam dano aos tecidos, causando perda de função e doença clínica (PHILIP; JOHN, 2011). Na resposta inflamatória periodontal, além dos leucócitos, células teciduais como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também são fontes de citocinas (CARRICHES et al., 2006). A manutenção da integridade dos tecidos periodontais e o combate aos produtos microbianos dependem diretamente do equilíbrio entre as diferentes citocinas e mediadores inflamatórios produzidos por células imunes reativas e com atividade supressora (CANDEL-MARTÍ et al., 2011).

Entre os mediadores produzidos após reconhecimento bacteriano, citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 foram as primeiras a terem seu papel reconhecido na patogênese da doença periodontal (GARLET, 2010). Diversas citocinas, como IL-1, IL-6 e IL-12, são encontradas em nível aumentado em biópsias de tecido periodontal e no fluido do sulco gengival de pacientes com periodontite (LINDBERG; BAGE, 2013). A IL-1 tem sido a citocina mais estudada na doença periodontal, exercendo potente ação indutora da reabsorção óssea e da secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Os níveis locais de IL-1 diminuem significativamente após realização do tratamento (HOWELLS, 1995).

TNF- α também está presente em níveis elevados no fluido crevicular gengival e nos tecidos periodontais doentes, onde está relacionada com a expressão de MMPs e RANKL, moléculas envolvidas na osteoclastogênese e reabsorção óssea (GRAVES; COCHRAN, 2003; GARLET et al., 2004; GRAVES, 2008). Em modelos animais de doença periodontal em ratos e primatas, foi demonstrado o papel central do TNF- α na resposta inflamatória, promovendo reabsorção de osso alveolar e perda de inserção de tecido conjuntivo (GRAVES; COCHRAN, 2003; GRAVES, 2008).

Nos tecidos periodontais, a citocina IL-6 é produzida por fibroblastos, linfócitos, monócitos e células epiteliais em resposta a LPS bacteriano, IL-1 e TNF- α (MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005). IL-6 apresenta níveis aumentados no fluido crevicular em pacientes com periodontite, da mesma forma que apresenta maior concentração no tecido gengival afetado, comparado com tecido gengival saudável em pacientes com periodontite (KURTIS et al., 1999). Também foi possível observar que o nível sistêmico de IL-6 diminuiu após tratamento periodontal não cirúrgico, melhorando a saúde do tecido gengival (MARCACCINI et al., 2009).

O papel da IL-12 na patogênese da doença periodontal ainda é contraditório. Enquanto estudos têm mostrado que a concentração de IL-12 é mais baixa nos tecidos afetados pela doença periodontal do que em tecidos gengivais saudáveis (JOHNSON; SERIO, 2005), outros afirmam que seus níveis diminuem no fluido crevicular gengival após a terapia periodontal inicial (THUNELL et al., 2009). Além disso, IL-12 está envolvida com a perda de osso alveolar em camundongos após infecção por *P. gingivalis* (SASAKI et al., 2008).

Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 estão elevados nos tecidos periodontais inflamados, o que pode estar relacionado à tentativa de controle dos mecanismos imunoinflamatórios com diminuição da gravidade da doença (LAPPIN et al., 2001; GARLET et al., 2004; GARLET et al., 2006). IL-10 pode atuar de várias maneiras para restringir a gravidade da periodontite. O controle de sinalização mediada por IL-10 pode incluir a inibição da transcrição de RNAm de diversas citocinas e outros mediadores inflamatórios, após ativação de receptores tipo toll (TLR) por produtos microbianos (YOSHIMURA et al., 2003). Este controle pode ser exercido por supressores de sinalização de citocinas (SOCS), que atuam para atenuar a transdução do sinal, como parte de um circuito fechado de realimentação negativa para inibir a resposta a estímulos subsequentes (YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). A expressão de SOCS-1 e SOCS-3 é significativamente mais elevada nos períodos de inatividade do que nos períodos de atividade de doença periodontal (GARLET et al., 2006). Curiosamente, os fibroblastos gengivais humanos não exibem tolerância a LPS mediada por proteínas SOCS, sugerindo um papel importante para este tipo de célula na manutenção da resposta inflamatória no ambiente periodontal (ARA et al., 2009).

As diferentes atividades de IL-10 são mediadas por meio de sua ligação ao receptor de IL-10 (IL-10R), expresso na superfície celular

(MIRMOHAMMADSADEGH et al., 1998). A ativação de monócitos está associada ao aumento da expressão de IL-10R, consistente com papel da citocina IL-10 como importante inibidor da atividade dessas células (MOORE et al., 2001). A expressão de IL-10R também tem sido observada em células de linhagem não hematopoiéticas, como em fibroblastos estimulados por LPS (WEBER-NORDT; MERAZ; SCHREIBER, 1994) e em queratinócitos estimulados por corticosteroides e vitamina D3 ativa (MICHEL et al., 1997a; MICHEL et al., 1997b).

1.4 Participação do ácido hialurônico nos processos imunoinflamatórios

Os fibroblastos são o principal tipo celular produtor de AH, expressando as três isoformas da enzima ácido hialurônico sintase (HAS) (LUKE; PREHM, 1999). A secreção do AH é estimulada pela lesão tecidual e mediadores inflamatórios como IL-1 e TNF- α . Por outro lado, os fragmentos de AH estimulam fibroblastos a liberar citocinas, regulam as respostas inflamatórias e facilitam a proliferação de fibroblastos mediada por TGF- β . Além disso, o AH modula a diferenciação de miofibroblastos TGF- β -dependentes (MASCARENHAS et al., 2004).

O extravasamento de leucócitos do sangue em resposta às exigências fisiológicas ou patológicas, por meio de interações de ligações complementares entre leucócitos e células endoteliais, ocorre através de um processo com várias etapas. Ligação do receptor CD44 expresso na superfície de linfócitos T ativados com moléculas de AH endoteliais promove uma interação adesiva primária, sob tensão de cisalhamento, contribuindo para o extravasamento nos locais de inflamação (DEGRENDELE et al., 1996; NANDI; ESTESS; SIEGELMAN, 2000). Citocinas pró-inflamatórias estimulam as células endoteliais a produzir AH em conjunto com outras moléculas de adesão ligantes de integrinas leucocitárias, como ICAM-1 e VCAM-1 (VIGETTI et al., 2010). A integrina alfa-4 beta-1 (VLA-4) é usada na adesão secundária após aderência primária de CD44 tanto em linfócitos T de ratos quanto de humanos (SIEGELMAN; STANESCU; ESTESS, 2000). A polarização e a migração dirigida de neutrófilos também são dependentes da expressão de CD44 e da sua interação com AH, o que pode modular a migração de neutrófilos para os tecidos inflamados (ALSTERGREN et al., 2004).

A ligação de anticorpos monoclonais ao receptor CD44 na superfície de macrófagos humanos estimula rapidamente a capacidade dos macrófagos em

fagocitar neutrófilos apoptóticos *in vitro*. Camundongos deficientes em CD44 sucumbem à inflamação incessante após lesão pulmonar não infecciosa, caracterizada pela depuração diminuída de neutrófilos apoptóticos (TAKAZOE et al., 2000).

As células de Langerhans são células dendríticas presentes na pele, as quais são cruciais para a iniciação de respostas imunes cutâneas. Pequenos fragmentos de AH de tetra e hexassacáridos aumentam a produção das citocinas IL-1, TNF- α e IL-12 por células dendríticas, bem como sua capacidade de apresentação antigênica. Estes pequenos fragmentos AH induzem a maturação de células dendríticas independentemente de CD44 ou do receptor de motilidade de AH (RHAMM), de maneira dependente dos receptores tipo Toll-4 (TLR4) (JIANG; LIANG; NOBLE, 2011).

Um estudo realizado por Mahaffey e Mummert (2007) demonstraram que a síntese inadequada de HA está correlacionada com uma redução na produção de IL-2 e IFN- γ , bem como com a expressão de superfície CD25 em linfócitos T, sugerindo papel do AH na proliferação de linfócitos T ativadas.

A infiltração, acúmulo e desgranulação de eosinófilos no pulmão é uma característica da asma ativa. Em um estudo *in vivo*, ficou comprovado que AH contribui para a sobrevivência de eosinófilos a longo prazo, aumentando o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) produzido em condições de asma (ESNAULT; MALTER, 2003).

A produção de citocinas locais dentro dos leitos vasculares inflamados pode aumentar a expressão de AH de superfície em células endoteliais, criando assim sítios locais receptivos à interação CD44/AH e, assim, o extravasamento de células inflamatórias. A IL-15 induz a expressão de AH endotelial *in vitro* e promove extravasamento de células T ativadas através de uma via dependente de CD44 *in vivo* (ESTEES et al., 1999). Componentes endógenos da matriz extracelular de AH podem estimular células endoteliais a reconhecer as lesões nos estágios iniciais da defesa e da resposta de reparação da ferida. A proliferação das células endoteliais induzida por AH é mediada pelo receptor CD44 e é acompanhada por uma ativação precoce de genes de resposta angiogênica (MOHAMADZADEH et al., 1998).

Durante o processo de reparo tecidual estimulado pela inflamação, monócitos podem ser recrutados e estimulados por diferentes citocinas, como IL-12, IL-4, IL-13, a se diferenciarem em um tipo de célula fibroblástica denominada fibrócito

(MAHARJAN; PILLING; GOMER, 2011). A adição de 300ng/mL de AH de alto peso molecular à monócitos de sangue periférico induziu diferenciação fibrocítica dessas células enquanto adição de mesma concentração de AH de baixo peso molecular inibiu esse processo (MAHARJAN; PILLING; GOMER, 2011). Outro estudo também verificou diferenças de atividades biológicas entre AH de alto e baixo peso moleculares. Campos et al. (2012), verificaram que AH de baixo peso molecular foi capaz de estimular a expressão de NF- κ B, TLR-4, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 por condrócitos de ratos, enquanto AH de alto peso molecular apresentou atividade inibitória dessa estimulação.

Incubação de AH de baixo e de alto peso moleculares com sangue de cordão umbilical *in vitro* causa aumento significativo da expressão de MMP9, IL-1 α , IL-8 e TNF- α por monócitos, embora apenas AH de alto peso molecular seja capaz de reduzir a expressão de TLR4 nesses monócitos (ØSTERHOLT et al., 2012). Além disso, após estimulação do sangue de cordão umbilical com LPS de *Escherichia coli*, AH de baixo e de alto peso moleculares afetaram de forma diferente a expressão desses marcadores imunológicos nos monócitos, sugerindo que AH pode afetar a resposta imunoinflamatória inicial por meio da regulação da expressão de receptores de LPS e de citocinas e enzimas envolvidas no combate aos microrganismos e destruição tecidual (ØSTERHOLT et al., 2012).

Baeva et al. (2013) realizaram estudo sobre como o AH de diferentes pesos moleculares pode afetar a produção de IL-1 β por macrófagos humanos. Macrófagos derivados de monócitos foram estimulados por IFN- γ e LPS de *Escherichia coli* e incubados com AH. AH de baixo peso molecular não apresentou alteração significativa na produção de IL-1 β na presença do LPS sozinho e na presença do LPS associado com IFN- γ , ao passo que AH de alto peso molecular diminuiu significativamente a produção de IL-1 β na presença do LPS sozinho ou associado a IFN- γ . Este estudo sugere que AH de baixo peso molecular apresenta um baixo potencial inflamatório e que AH de alto peso molecular apresenta ação anti-inflamatória.

Adição de AH de alto peso molecular foi capaz de suprimir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de ratos estimulados com LPS de *Escherichia coli* e IFN- γ . Por outro lado, AH de baixo peso molecular aumentou ligeiramente a sua produção. Entretanto, quando as células foram estimuladas por baixas doses de

LPS e exibiam menor produção de mediadores inflamatórios, a ação do AH não alterou significativamente a produção de NO (LYLE et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido hialurônico na expressão de citocinas e receptor de citocinas por monócitos humanos *in vitro* estimulados por lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis*.

2.2 Objetivos específicos

- a) determinar a frequência de monócitos produtores das citocinas IL-1alfa, IL-6, IL-10 e IL-12, após estimulação com LPS de *P. gingivalis* e após incubação com ácido hialurônico;
- b) determinar a frequência de monócitos expressando o receptor de IL-10 (IL-10R), após estimulação com LPS de *P. gingivalis* e após incubação com ácido hialurônico.

3 ARTIGO

Ácido hialurônico aumenta a expressão do receptor de IL-10 em monócitos humanos estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis*

Os resultados dessa dissertação foram compilados na forma de artigo científico a ser submetido à Revista da Faculdade de odontologia de Lins, Qualis B4 pela classificação da CAPES de 2013. As normas do periódico podem ser acessadas em:

<https://www.metodista.br/revistas/revistasunimep/index.php/FOL/about/submissions#authorGuidelines>.

Ácido hialurônico aumenta a expressão do receptor de IL-10 em monócitos humanos estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis*

Hyaluronic acid increases expression of the IL-10 receptor in human monocytes stimulated with LPS of *Porphyromonas gingivalis*

Bruno Ramos Lima
Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Luisa M.D. Magalhães
Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Walderez Ornelas Dutra
Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Kenneth J. Gollob
Programa de Pós-graduação em Medicina da Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Tarcília Aparecida da Silva
Programa de pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Martinho Campolina Rebello Horta
Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Paulo Eduardo Alencar de Souza
Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Autor correspondente:

Paulo Eduardo Alencar de Souza. Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Avenida Dom José Gaspar, 500. Prédio 46. Sala 101. Coração Eucarístico. Belo Horizonte - Minas Gerais. Brasil. CEP: 30535-901.

E-mail: pauloalencar@pucminas.br.

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um componente da matriz extracelular que tem sido utilizado no tratamento de inflamações articulares e da doença periodontal. AH é clinicamente aplicado diretamente nos tecidos ósseo, gengival e do ligamento periodontal. Sua utilização pode afetar os mecanismos imunoinflamatórios nesses tecidos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do AH na produção de citocinas por monócitos estimulados *in vitro* por lipopolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Células mononucleares de sangue periférico de nove indivíduos saudáveis foram estimuladas com LPS de *P. gingivalis* e em seguida incubadas com AH. A produção das citocinas IL-1alfa, IL-6, IL-10 e IL-12, bem como a expressão do receptor de IL-10 (IL-10R) por monócitos, foram quantificadas por meio de reações de imunofluorescência e análise por citometria de fluxo. O teste ANOVA um critério com repetição seguido do teste *post hoc* de Bonferroni foram utilizados com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a incubação com AH, embora não tenha afetado as frequências de monócitos produtores das citocinas avaliadas, aumentou a frequência de monócitos expressando IL-10R quando comparado ao grupo estimulado apenas com LPS. Nossos dados sugerem que AH pode desempenhar funções de modulação da resposta imunoinflamatória estimulada por LPS de periodontopatógeno por meio da estimulação da expressão do receptor de IL-10 em monócitos.

Palavras-chave: ÁCIDO HIALURÔNICO, CITOCINAS, LIPOPOLISSACARÍDEO, *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*, MONÓCITOS.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a component of the extracellular matrix that has been used to treat joint inflammation and periodontal disease. HA is clinically applied directly to bone tissue, gingival and periodontal ligament. Its use can affect the immunoinflammatory mechanisms in these tissues. The objective of this study was to evaluate the effect of HA on cytokine production by monocytes stimulated *in vitro* by lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis*. Mononuclear cells from peripheral blood of nine healthy subjects were stimulated with LPS of *P. gingivalis* and then incubated with HA. The production of IL-1alpha, IL-6, IL-10 and IL-12, as well as the expression of IL-10 receptor (IL-10R) by monocytes were quantified by reactions immunofluorescence and flow cytometry analysis flow. The ANOVA with repeated criterion followed by Bonferroni *post hoc* tests were used with a significance level of 5%. The results showed that incubation with PA, though not affected frequencies producers of cytokines evaluated monocytes, increased frequency of monocytes expressing IL-10R as compared to the group stimulated with LPS only. Our data suggest that HA may act as the modulation of immunoinflammatory response stimulated by LPS periodontopathogen by stimulating the expression of the IL-10 receptor on monocytes.

Keywords: HYALURONIC ACID, CYTOKINES, LIPOPOLYSACCHARIDE, *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*, MONOCYTES.

INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear da matriz extracelular do tecido conjuntivo presente nas mucosas, tecidos periodontais mineralizados e não mineralizados e em muitos outros órgãos do corpo. Por ser um componente importante da matriz extracelular e contribuir significativamente para hidrodinâmica dos tecidos através de sua influência na migração e proliferação celular, o AH participa ativamente do processo de reparo de feridas.^{1,2}

Ao se ligar em diferentes receptores celulares, o AH regula vários processos biológicos, incluindo osteocondução, inflamação e invasão tumoral.³ Devido à sua ação estimuladora do reparo tecidual, o AH está sendo utilizado como adjunto em tratamentos periodontais, como raspagem e alisamento radicular, cirurgias mucogengivais e na reparação alveolar e de defeitos ósseos.

Tem sido sugerido que o AH pode ter um efeito benéfico no tratamento da gengivite induzida por placa, na manutenção da saúde perimplantar e de tecidos em regeneração óssea.⁴ O AH tem mostrado efeitos anti-inflamatório e antibacteriano, além de capacidade de reduzir o edema em tratamentos de gengivite e periodontite. Tem sido sugerido que o efeito anti-inflamatório pode ser devido à ação exógena do AH, reduzindo a biodisponibilidade de prostaglandinas, metaloproteinases e outras moléculas bio-ativas presentes no meio extracelular.¹

O contato direto do AH com os tecidos ósseo e conjuntivo fibroso do periodonto pode causar alterações nos processos celulares periodontais, os quais mantêm a integridade tecidual e o combate aos produtos microbianos provenientes do sulco gengival por meio da ação de células inflamatórias.⁵ Essas células são importantes fontes de citocinas, as quais são responsáveis pelo controle dos processos imunoinflamatórios. Assim, alterações quantitativas e qualitativas na produção das citocinas podem causar um desequilíbrio na resposta imunoinflamatória periodontal protetora, afetando o combate aos microorganismos e a preservação da integridade tecidual.⁶

O estudo do efeito do AH na produção de citocinas por células imunocompetentes estimuladas por produtos de periodontopatógenos pode contribuir para a melhor compreensão sobre sua ação nos mecanismos imunoinflamatórios periodontais. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ácido hialurônico nas características funcionais de monócitos humanos *in vitro* estimulados por lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis*, determinando a frequência de monócitos produtores das citocinas IL-1alfa, IL-6, IL-10 e IL-12, após estimulação com LPS de *P. gingivalis* e após incubação com ácido hialurônico, e a

frequência de monócitos expressando o receptor de IL-10 (IL-10R), após estimulação com LPS de *P. gingivalis* e após incubação com ácido hialurônico.

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (CAAE: 22097313.0.0000.5137) e conduzido de acordo com as normas deste comitê.

Incubação de CMSP com *P. gingivalis* e ácido hialurônico

Foram coletados 10mL de sangue de nove indivíduos saudáveis, por meio de punção de veia periférica, utilizando-se tubos *vacutainer* heparinizados (Beckton e Dickinson). Todos os indivíduos participantes eram adultos e não faziam uso de medicamentos capazes de interferir na resposta imunoinflamatória. Para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP), o sangue foi diluído em tampão fosfato-salina (PBS) na proporção 1:1 e em seguida aplicado cuidadosamente sobre 10mL de Ficoll-Paque (Pharmacia) em tubo Falcon de 50mL. Após centrifugação a 200g, por 40 minutos, à 20° C, as CMSP foram recolhidas e lavadas 3 vezes com tampão fosfato-salina (PBS) 0,015M, pH 7,4. Após contagem em câmara hemocitométrica, as CMSP foram ressuspensas para concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL em meio Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich), acrescido de 2mM de L-glutamina, 100UI/mL de penicilina G potássica, 100µg/mL de estreptomicina e 5% de soro humano normal. As células foram transferidas para tubos foscos de polipropileno de 3mL e submetidas a três condições: 1) Controle; 2) LPS e 3) LPS+AH. No grupo Controle, as CMSP foram mantidas em meio RPMI completo. Nos grupos LPS e LPS+AH, foi adicionado lipopolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (Lot# LPG 34-23) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) na concentração final de 200ng/mL e as células foram incubadas por 6 horas em estufa úmida à 36°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, no grupo LPS+AH, foi adicionado ácido hialurônico (Jiangxi Pharmaceutical Group Corporation - JXPGC, Jiangxi, China) para concentração final de 0,2% em cultura. As células foram incubadas por mais 20 horas em estufa a 36° C, 5% de CO₂, perfazendo tempo total de incubação com LPS de 26 horas. Quatro horas antes do término da incubação, foi adicionada Brefeldina A (1µg/mL) (E Biociensce, San Diego, CA, USA), a

qual bloqueia a secreção de proteínas, concentrando as citocinas no complexo de Golgi das células.

Reações de imunofluorescência

Para reações de imunofluorescência foi utilizado protocolo semelhante ao descrito por SOUZA et al. (2005).⁷ Após culturas de curta duração, 2×10^5 CMSP foram transferidas para cada poço de placa de 96 poços de fundo em “U” e lavadas com PBS contendo 0,01% de azida (centrifugação a 200g, 4° C, 10 minutos). Para marcação de antígenos de superfície celular (CD14 e IL-10R) foram adicionadas soluções contendo anticorpos monoclonais diluídos em PBS, contendo 0,01% de azida e 0,2% de albumina bovina sérica (BSA). Após 15 minutos de incubação à 4° C, as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 2% diluído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Para marcação intracitoplasmática, as células foram lavadas e permeabilizadas com saponina 0,5% (Sigma Aldrich) por 10 minutos, à temperatura ambiente, e em seguida incubadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas IL-1alfa, IL-6, IL-10 e IL-12 conjugados a diferentes fluorocromos, por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas por adição de solução de permeabilização seguida de centrifugação (10 minutos, 200g, 4° C). Finalmente, as amostras foram ressuspensas em tampão PBS com 0,1% de BSA e 0,1% azida, para análises por citometria de fluxo. Para todas as reações de imunofluorescência foram acrescentados controles isotípicos (controle negativo) conjugados aos mesmos fluorocromos utilizados nas marcações em questão. As especificações dos anticorpos utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunofluorescência.

Especificidade	Fluorocromo conjugado	Clone	Fabricante	Diluição
CD14	Bv421	M5E2	BioLegend	1:40
IL-1a	FITC	CRM8	Ebioscience	1:10
IL-6	APC	MQ2-1395	BioLegend	1:10
IL-10	PeCy7	JES3-9D7	BioLegend	1:10
IL-10R (CD210)	PE	3F9	BioLegend	1:10
IL-12p40/70	PE	C8.6	Ebioscience	1:10

Análises citométricas

As imunomarcações foram quantificadas por meio do citômetro de fluxo FACSCantoTMII (Becton Dickinson, New Jersey, USA), com aquisição de dados de 70.000 células em cada tubo analisado. As populações de células monocíticas foram selecionadas de acordo com sua localização no gráfico tamanho *versus* granulosidade obtido por meio do software FlowJo 7.6.5 (Tree Star Inc., USA). Foram determinadas também as populações de monócitos CD14 positivos. Em seguida, foram realizadas as quantificações de células positivas para cada antígeno avaliado e os resultados foram expressados como percentagem de células positivas na população de monócitos ou percentagem de células positivas na população de monócitos CD14 positivos.

Análise estatística

O teste de D'Agostino e Pearson demonstrou que os dados apresentaram distribuição normal. Foi utilizado teste ANOVA um critério com repetição seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni para avaliar a existência de diferenças entre os grupos avaliados. O nível de significância foi estabelecido em 5%. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

As análises citométricas revelaram que a incubação com LPS levou a um aumento significativo na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 por monócitos (Tabela 2). Entretanto, a incubação com AH não afetou significativamente a frequência de monócitos produtores de IL-1 α , IL-6, IL-10 e IL-12 (Tabela 2). Incubação com AH aumentou significativamente as frequências de células expressando o receptor de IL-10 (IL-10R) na população total de monócitos, bem como na população de monócitos CD14+ (Tabela 3).

Tabela 2 – Frequências (%) de células imunomarcadas para citocinas na população geral de monócitos (total) e na população de monócitos CD14+ (em CD14).

Parâmetro	Meio		LPS		LPS + AH		Valor de p*
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
IL-1 α total	6.37	3.72	46.03	13.86	45.38	11.54	<0.05 ^{1,2} / ns ³
IL-1 α em CD14	10.91	5.62	69.21	17.34	75.49	9.49	<0.05 ^{1,2} / ns ³
IL-6 total	3.28	1.67	18.41	9.51	16.96	6.90	<0.05 ^{1,2} / ns ³
IL-6 em CD14	5.16	1.75	28.81	15.40	29.99	12.21	<0.05 ^{1,2} / ns ³
IL-10 total	10.12	5.01	11.03	7.40	9.09	7.11	ns ^{1,2,3}
IL-10 em CD14	12.29	7.17	10.67	7.78	9.32	5.91	ns ^{1,2,3}
IL-12 total	4.87	1.56	5.73	2.79	4.73	2.92	ns ^{1,2,3}
IL-12 em CD14	8.69	2.95	8.33	3.78	6.92	3.98	ns ^{1,2,3}

* valores de *p* obtidos pelo teste ANOVA um critério com repetição seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

ns – não significante ($p > 0,05$)

DP – Desvio padrão

¹ Meio *versus* LPS

² Meio *versus* LPS+AH

³ LPS *versus* LPS+AH

Tabela 3 – Frequências (%) de células imunomarcadas para o receptor de IL-10 (IL-10R) na população total de monócitos e na população de monócitos CD14+ (em CD14).

Parâmetro	Meio		LPS		LPS + AH		Valor de p*
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
IL-10R total	3.73	0.99	3.85	1.19	5.94	2.01	<0.05 ^{2,3} / ns ¹
IL-10R in CD14	5.24	0.71	4.76	1.20	11.15	4.69	<0.05 ^{2,3} / ns ¹

* valores de *p* obtidos pelo teste ANOVA um critério com repetição seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

ns – não significante ($p > 0,05$)

DP – Desvio padrão

¹ Meio *versus* LPS

² Meio *versus* LPS+AH

³ LPS *versus* LPS+AH

DISCUSSÃO

O ácido hialurônico tem sido utilizado na periodontia para tratamentos de bolsas periodontais. Tem sido utilizado em procedimentos cirúrgicos e não-cirúrgicos na forma de gel aplicado diretamente nos tecidos periodontais. Em diversos estudos foi possível observar uma melhora significativa de alguns parâmetros clínicos como sangramento à sondagem, ganho de inserção clínica e diminuição de profundidade à sondagem.^{8,9,10}

Em nosso trabalho foi possível observar que a incubação com LPS de *P. gingivalis* levou a um aumento significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 na população geral de monócitos e na população de monócitos CD14+. Porém, AH não foi capaz de alterar as frequências de monócitos produtores das citocinas IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 sob estimulação por LPS de *P. gingivalis*.

Em outros trabalhos foi verificado que o AH afetou a expressão de citocinas por células imunocompetentes incubadas com produtos de *Escherichia coli*. Østerholt et al. (2012)¹¹ incubaram AH de baixo e de alto peso moleculares com sangue de cordão umbilical *in vitro*, causando um aumento significativo da expressão de MMP9, IL-1 α , IL-8 e TNF- α por monócitos. Esses autores observaram ainda que apenas AH de alto peso molecular foi capaz de reduzir a expressão de TLR4 nesses monócitos. Além disso, após estimulação do sangue de cordão umbilical com LPS de *Escherichia coli*, AH de baixo e de alto peso moleculares afetaram de forma diferente a expressão desses marcadores imunológicos nos monócitos, sugerindo que AH pode afetar a resposta imunoinflamatória inicial por meio da regulação da expressão de receptores de LPS e de citocinas e enzimas envolvidas no combate aos microrganismos e na destruição tecidual.

Baeva et al. (2014)¹² verificaram que AH de diferentes pesos moleculares podem afetar a produção de IL-1 β por macrófagos humanos estimulados por IFN- γ e LPS de *Escherichia coli*. AH de baixo peso molecular não alterou significativamente a produção de IL-1 β na presença do LPS sozinho e na presença do LPS associado com IFN- γ , ao passo que AH de alto peso molecular diminuiu significativamente a produção de IL-1 β na presença do LPS sozinho ou associado a IFN- γ . Este estudo sugere que AH de baixo peso molecular apresenta um baixo potencial inflamatório e que AH de alto peso molecular apresenta ação anti-inflamatória.

Em outro estudo, adição de AH de alto peso molecular foi capaz de suprimir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de ratos estimulados com LPS de *Escherichia coli* e IFN- γ . Por outro lado, AH de baixo peso molecular aumentou ligeiramente a sua

produção. Entretanto, quando as células foram estimuladas por baixas doses de LPS e exibiam menor produção de mediadores inflamatórios, a ação do AH não alterou significativamente a produção de NO.¹³

De acordo com nossos resultados, foi possível observar que AH não foi capaz de afetar a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 por monócitos humanos estimulados por LPS de *P. gingivalis*. Interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) são importantes mediadores da inflamação, por induzirem alterações no endotélio vascular, estimular o recrutamento leucocitário e os mecanismos efetores da imunidade celular.¹⁴ A IL-1 tem sido a citocina mais estudada na doença periodontal, exercendo potente ação indutora da reabsorção óssea e da secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais.¹⁵ Os níveis locais de IL-1 diminuem significativamente após realização do tratamento.¹⁶ IL-6 apresenta níveis aumentados no fluido crevicular gengival em pacientes com periodontite, da mesma forma que apresenta maior concentração no tecido gengival afetado, comparado com tecido gengival saudável em pacientes com periodontite.¹⁷

IL-12 é produzida principalmente por macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B em resposta a produtos bacterianos e parasitas intracelulares.¹⁸ Atua estimulando a diferenciação de linfócitos T virgens no subtipo Th1, os quais são determinantes na resistência e combate a microrganismos intracelulares.¹⁹ O papel da IL-12 na patogênese da doença periodontal ainda é contraditório. Enquanto estudos têm mostrado que a concentração de IL-12 é mais baixa nos tecidos afetados pela doença periodontal do que em tecidos gengivais saudáveis,²⁰ outros afirmam que seus níveis diminuem no fluido crevicular gengival após a terapia periodontal inicial.²¹

Diferentemente da produção de citocinas, a incubação com AH aumentou a frequência de monócitos expressando receptor de IL-10 (IL-10R) tanto na população geral de monócitos, quanto na população de monócitos CD14+. As diferentes atividades de IL-10 são mediadas por meio do receptor de IL-10 (IL-10R), expresso na superfície das células.²² A ativação de monócitos esta associada com o aumento da expressão de IL-10R, consistente com papel da citocina IL-10 como importante inibidor da atividade dessas células.²³ A expressão de IL-10R também tem sido observada em células de linhagem não hematopoiéticas, como em fibroblastos estimulados por LPS²⁴ e em queratinócitos estimulados por corticosteroides e vitamina D3 ativa.^{25,26}

A presença de IL-10R está diretamente relacionada à presença de IL-10. Como o AH estimulou o aumento de IL-10R, este seria responsável por se ligar a um maior número de

citocinas IL-10. Assim, IL-10 R pode modular a resposta inflamatória, aumentando a ação da citocina IL-10, conseqüentemente inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α , permitindo um favorecimento aos fibroblastos gengivais e uma melhor regeneração tecidual.

Alguns autores²³ afirmam que a expressão do IL-10R é aumentada quando monócito está ativado. Nossos resultados mostraram que a estimulação com LPS gera ativação de monócitos verificada pelo aumento significativo das populações de monócitos produtoras de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1a e IL-6. Entretanto, as frequências de monócitos expressando IL-10R foram significativamente maiores no grupo tratado com LPS+AH do que naquele apenas estimulado com LPS, indicando que esse aumento de IL-10R seja devido à ação do AH e não apenas explicado pela ativação dos monócitos pelo LPS.

Este é o primeiro estudo na literatura que avaliou a influência do AH em células imunocompetentes sob estimulação com produtos de periodontopatógenos. Embora outros estudos tenham mostrado efeito do AH na expressão de citocinas por células estimuladas com LPS de *E. coli*, em nosso estudo a expressão das citocinas avaliadas não foi afetada dentro de um ambiente estimulado por LPS de *P. gingivalis*. Existem limitações no nosso modelo que dificultam a discussão de nossos achados com os demais da literatura, como o tipo de LPS bacteriano utilizado como estímulo para os leucócitos, a concentração de AH e tempo de incubação e o peso molecular do AH utilizado.

Finalmente, nosso estudo mostrou que AH é capaz de aumentar a expressão de IL-10R em monócitos estimulados por LPS de *P. gingivalis*, o que nos leva a especular que AH pode modular a resposta imunoinflamatória periodontal aumentando a resposta de monócitos à citocina IL-10. Novos estudos são necessários em ambientes imunoinflamatórios estimulados por produtos microbianos de periodontopatógenos para esclarecer o papel do AH na sinalização intercelular e sua relevância clínica no tratamento da doença periodontal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O AH apresenta-se como um promissor agente na regeneração tecidual. Nosso estudo mostrou que AH é capaz de aumentar a expressão de IL-10R em monócitos estimulados por LPS de *P. gingivalis*, o que nos leva a especular que AH pode modular a resposta imunoinflamatória periodontal aumentando a reposta de monócitos à citocina IL-10. Existem limitações no nosso modelo que dificultam a interpretação dos nossos resultados. Novos estudos são necessários em ambientes imunoinflamatórios estimulados por produtos microbianos de periodontopatógenos para esclarecer o papel do AH na sinalização intercelular e sua relevância clínica no tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

1. Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. **Indian J Dental Res** 2010;21(4):575-8.
2. Tamari M, Nishino Y, Yamamoto N, Ueda M. Acceleration of wound healing with stem cell-derived growth factors. **Int J Oral Maxillofac Implant** 2013;28(6):e369-75.
3. Tanaka K, Goto T, Miyazaki T, Morita Y, Kobayashi S, Takahashi T. Apatite-coated hyaluronan for bone regeneration. **J Dental Res** 2011;90(7):906-11.
4. Galli F, Zuffetti F, Capelli M, Fumagalli L, Parenti A, Testori T et al. Hyaluronic acid to improve healing of surgical incisions in the oral cavity: a pilot multicenter placebo-controlled randomised clinical trial. **Eur J Oral Implantol** 2008;1(3):199-206.
5. Lindhe J, Karring T, Lang NP. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
6. Abbas A, Lichtman AH. **Imunologia básica**. Funções e distúrbios do sistema imunológico. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
7. Souza PEA, Gomez RS, Xavier GM, Santos JS, Gollob KJ, Dutra WO. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. **J Oral Pathol & Med** 2005;34(5):312-17.
8. Pistorius A, Martin M, Willershausen B, Rockmann P. The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. **Quint Int** 2005;36:531-8.
9. Karim FE-S, Dahaba M, Shadw A-E, Darhous, M. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. **Clin Oral Invest** 2012;16(4):1229-36.

10. Pilloni A, Annibali S, Dominici F, Di Paolo C, Papa M, Cassini MA, et al. Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinica parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. **Annali di Stomatol** 2011;3-9.
11. Østerholt HCD et al. The impact of hyaluronan on monocyte Toll-like receptor expression in term infant cord blood. **Acta Paediatr** 2012;101:06-13.
12. Baeva LF, Lyle DB, Rios M, Langone JJ, Lightfoote MM. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1 β production. **J Biomed Mater Res A** 2014;102(2):305-14.
13. Lyle DB, Breger JC, Baeva LF, Shallcross JC, Durfor CN, Wang NS et al. Low molecular weight hyaluronic acid effects on murine macrophage nitric oxide production. **J Biomed Mater Res A** 2010;94:893-904.
14. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molec Immunol** 2002;38(12-13):881-5.
15. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol** 1993;64:474-84.
16. Howells GL. Cytokine networks in destructive periodontal disease. **Oral Dis** 1995;1:266-70.
17. Kurtis B, Develioğlu H, Taner IL, Baloş K, Tekin IO et al. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. **J Oral Sci** 1999;41:163-7.
18. Queiroz-Junior CM, Silva CM, Barbosa MJ, Corrêa JD, Madeira MFM, Garlet TP et al. A Controversial Role for IL-12 in Immune Response and Bone Resorption at Apical Periodontal Sites. **Clin Develop Immun** 2010;8:1-8.
19. Yun PLW et al. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. **Infection Immun** 2001;69(9):5650-60.
20. Johnson RB, Serio FG. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontol** 2005;76:785-90.
21. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. **J Period Res** 2010;45(1):148-52.
22. Mirmohammadsadegh A, Homey B, Abts HF, Köhrer K, Ruzicka T, Michel G et al. Differential Modulation of Pro- and Antiinflammatory Cytokine Receptors by N-(4-Trifluoromethylphenyl)-2-Cyano-3-Hydroxy-Crotonic Acid Amide (A77 1726), the

Physiologically Active Metabolite of the Novel Immunomodulator Leflunomide. **Biochem Pharmacol** 1998;55(9):1523-9.

23. Moore KW, De Waal MR, Coffman RL, O'garra AI. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Ann Rev Immun** 2001;19:683-765.
24. Weber-Nordt RM, Meraz MA, Schreiber RD. LPS-dependent induction of IL- 10 receptor expression on murine fibroblasts. **J Immunol** 1994;153:3734-44.
25. Michel G, Gailis A, Jarzebska-Deussen B, Muüschen A, Mirmohammadsadegh A, Ruzicka T, et al. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. **Inflamm Res** 1997a;46(1):32-4.
26. Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E, Jarzebska-Deussen B, Müschen A, Kemény L, et al. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down- modulation by IL-8, and upregulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. **J Immunol** 1997b;159:6291-97.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O AH apresenta-se como um promissor agente na regeneração tecidual. Nosso estudo mostrou que AH é capaz de aumentar a expressão de IL-10R em monócitos estimulados por LPS de *P. gingivalis*, o que nos leva a especular que AH pode modular a resposta imunoinflamatória periodontal aumentando a resposta de monócitos à citocina IL-10. Existem limitações no nosso modelo que dificultam a interpretação dos nossos resultados. Novos estudos são necessários em ambientes imunoinflamatórios estimulados por produtos microbianos de periodontopatógenos para esclarecer o papel do AH na sinalização intercelular e sua relevância clínica no tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica**. Funções e distúrbios do sistema imunológico. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- ALSTERGREN, P. et al. Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell surface expression of CD44. **Cellular Immunology**, v.231, n.1-2, p. 146-157, 2004.
- ARA, T. et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.44, p. 21-27, 2009.
- ASLAN, M.; SIMSEK, G.; DAYI, E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. **Journal of Biomaterials Applications**, v.20, p. 209-220, 2006.
- ATHANASOU, N.A. Cellular biology of bone-resorbing cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.78-A, n.7, p. 1096-1112, 1996.
- BAEVA, L.F. et al. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1 β production. **Journal of Biomedical Mater Research Part A**, v.94, n.3, p. 893-904, 2013.
- BAKOS, D.; SOLDAN, M.; HERNANDEZ-FUENTES, I. Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite. **Biomaterials**, v.20, n.2, p. 191-195, 1999.
- BANSAL, J.; KEDIGE, S.D.; ANAND, S. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. **Indian Journal of Dental Research**, v.21, n.4, p. 575-578, 2010.
- BERTOLINI, D.R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. **Reviews Nature**, v.319, p. 516-518, 1986.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v.64, p. 474-484, 1993.
- BOGOVIĆ, A. et al. Effect of hyaluronic acid on pulp cells. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v.62, p. 155-161, 2011.
- BRASILEIRO-FILHO, G.B. **Patologia Geral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.
- BRIGÚGLIO, F. et al. Treatment of infrabony periodontal defects using a resorbable biopolymer of hyaluronic acid: A randomized clinical trial. **Quintessence International Periodontology**, v.44, n.3, p. 231-240, 2013.

CAMPOS, G.M. et al. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.**, v.38, n.1, p. 69-76, 2012.

CANDEL-MARTÍ, M.E. et al. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.16, n.4, p. 518-521, 2011.

CARRICHES, C.L.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.M.; RODRÍGUEZ, M.D. Variations of interleukin-6 after surgical removal of lower third molars. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.11, p. 520-526, 2006.

COLNOT, C. et al. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v.435, p. 69-78, 2005.

COMMINS, S.; STEINKE, J.W.; BORISH, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.121, p. 1108-1111, 2008.

COUPER, K.N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology**, v.180, p. 5771-5777, 2008.

DEGRENDELE, H.C. et al. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v.183, p. 1119-1130, 1996.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest Journal**, v.118, p. 503-508, 2000.

ESNAULT, S.; MALTER, J.S. Hyaluronic acid or TNF-alpha plus fibronectin triggers granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA stabilization in eosinophils yet engages differential intracellular pathways and mRNA binding proteins. **Journal of Immunology**, v.171, p. 6780-6787, 2003.

ESTEES, P. et al. Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression in vitro and promotes activated T cell extravasation through a CD44-dependent pathway in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v.190, p. 9-19, 1999.

FERGUSON, E.L. et al. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments. **International Journal of Pharmaceutics**, v.420, p. 84-92, 2011.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Inflammation and Allergy - Current Drug Targets**, v.4, p. 281-286, 2005.

GALLI, F. et al. Hyaluronic acid to improve healing of surgical incisions in the oral cavity: a pilot multicenter placebo-controlled randomised clinical trial. **European Journal of Oral Implantology**, v.1, n.3, p. 199-206, 2008.

GARLET, G.P. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. **Journal of Dental Research**, v.89, n.12, p. 1349-1363, 2010.

GARLET, G.P. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.31, p. 671-679, 2004.

GARLET, G.P. et al. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? **Journal of Periodontal Research**, v.41, p. 580-584, 2006.

GLOWACKA, A. et al. IL-8, IL-12 and IL-10 cytokines generation by neutrophils, fibroblasts and neutrophils-fibroblasts interaction in psoriasis. **Advances in Medical Sciences**, v.55, n.8, p. 1-7, 2010.

GRAVES, D.T. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.79, p. 1585-1591, 2008.

GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.74, p. 391-401, 2003.

HARRISON, J.R. et al. Interleukin-1 represses COLIA1 promoter activity in calvarial bones of transgenic ColCAT mice *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.13, p. 1076-1083, 1998.

HOROWITZ, M.; KACENA, M.; LORENZO, J. Genetics and mutations affecting osteoclast development and function. **Bone resorption**, p. 91-107, 2005.

HOWELLS, G.L. Cytokine networks in destructive periodontal disease. **Oral Diseases**, v.1, p. 266-270, 1995.

HUEBER, A. J. et al. Embracing novel cytokines in RA-complexity grows as does opportunity! **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.24, n.4, p. 479-487, 2010.

JIANG, Y. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **The Journal of Immunology**, v.148, p. 2423-2428, 1992.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.76, p. 785-790, 2005.

JOVANOVIC, D.V. et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **Journal of Immunology**, v.160, p. 3513-3521, 1998.

KARIM, M. et al. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. **Clinical Oral Investigation**, v.16, p. 1229-1236, 2012.

KINDLE, L. et al. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. **Jornal of Bone and Mineral Research**, v.21, p. 193-206, 2006.

KON, T. et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. **Jornal of Bone and Mineral Research**, v.16, p. 1004-1014, 2001.

KOPF, M.; BACHMANN, M.F.; MARSLAND, B.J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. **Nature reviews. Drug discovery**, v.9, p. 703-718, 2010.

KURTIS, B. et al. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. **Journal of Oral Sciences**, v.41, p. 163-167, 1999.

LAPPIN, D. F. et al. Antiinflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. **Clinical and Experimental Immunology**, v.123, p. 294-300, 2001.

LARCHE, M. Regulatory T-cells in allergy and asthma. **Chest Journal**, v.132, p. 1000-1014, 2007.

LINDBERG, T.Y.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Reviews**, v.15, n.7, 2013.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. 5a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LUKE, H.J.; PREHM, P. Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and no metastatic melanoma cells. **Biochemistry Journal**, v.343, p. 71-75, 1999.

LYLE, D.B. et al. Low molecular weight hyaluronic acid effects on murine macrophage nitric oxide production. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.94, p. 893-904, 2010.

MADIANOS, P. N.; BOBETSIS, Y. A.; KINANE, D. F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. **Journal of Clinical Periodontology**, v.32, n.6, p. 57-71, 2005.

MAHAFFEY, C.L.; MUMMERT M.E. Hyaluronan synthesis is required for il-2-mediated t cell proliferation. **The Journal of Immunology**, v.179, n.12, p. 8191-8199, 2007.

MAHARJAN, A.S.; PILLING, D.; GOMER, R.H.; High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation. **PLoS ONE**, v.6, n.10, 2011.

MARCACCINI, A. M. et al. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. **Journal of Periodontology**, v.80, p. 594-602, 2009.

MASCARENHAS, M.M. et al. Low molecular weight hyaluronan from stretched lung enhances interleukin-8 expression. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.30, p. 51-60, 2004.

MAYNARD, C.L.; WEAVER, C.T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell mediated immune regulation. **Immunological Reviews**, v.226, p. 219-233, 2008.

MENDES, R.M. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. **Archives of Oral Biology**, v.53, p. 1155-1162, 2008.

MICHEL, G. et al. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. **Inflammation Research**, v.46, p. 32-34, 1997a.

MICHEL, G. et al. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down- modulation by IL-8, and upregulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. **Journal of Immunology**, v.159, p. 6291-6297, 1997b.

MIRMOHAMMADSADEGH, A. et al. Differential modulation of pro- and antiinflammatory cytokine receptors by N-(4 Trifluoromethylphenyl)-2-Cyano-3-hydroxy-crotonic acid amide (A77 1726), the physiologically active metabolite of the novel immunomodulation leflunomide. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p. 1523-1529, 1998.

MOHAMADZADEH, M. et al. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p. 97-108, 1998.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v.19, p. 683-765, 2001.

NANDI, A.; ESTESS, P.; SIEGELMAN, M.H. **Journal of Biology Chemistry**, v.275, p. 14939-14948, 2000.

NAUNDORF, S. et al. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. **European Journal of Immunology**, v.39, p. 1066-1077, 2009.

NOBRE, M.A.; CARVALHO, R.; MALO, P. Nonsurgical treatment of peri-implant pockets: An exploratory study comparing 0.2% chlorhexidine and 0.8% hyaluronic acid. **Canadian Journal of Dental Hygiene**, v.43, n.1, p. 25-30, 2009.

NOLAN, A. et al. The efficacy of topical hyaluronic acid in the management of recurrent aphthous ulceration. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.35, p. 461-465, 2006.

ØSTERHOLT, H.C.D. et al. The impact of hyaluronan on monocyte Toll-like receptor expression in term infant cord blood. **Acta Paediatrica**, v.101, p. 706-713, 2012

QUEIROZ-JUNIOR, C.M. et al. A Controversial Role for IL-12 in Immune Response and Bone Resorption at Apical Periodontal Sites. **Clinical and Developmental Immunology**, v.8, p. 1-8, 2010.

PARK, M.S. et al. Rheological properties of hyaluronic acid and its effects on salivary enzymes and candida. **Oral Diseases**, v.16, p. 382-387, 2010.

PESCHON, J.J. et al. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. **Journal of Immunology**, v.160, p. 943-952, 1998.

PILLONI, A. et al. evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinica parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. **Annali di Stomatologia**, p. 3-9, 2011.

PISTORIUS, A. et al. The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. **Quintessence International**, v.36, p. 531-538, 2005.

PHILIP, M.P.; JOHN, J.T. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, n.11, p. 60-84, 2011.

ROMAGNANI, S. Citokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v.38, n.12-13, p. 881-885, 2002.

SADOWITS, B.M.D. et al. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. **Journal of Surgical Research**, v.173, p. 63-72, 2012.

SASAKI, H. et al. T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. **Journal of Immunology**, v.180, n.9, p. 6193-6198, 2008.

SASAKI, T.; WATANABE, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. **Bone**, v.1, n.16, p. 9-15, 1995.

SIEGELMAN, M.H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **Journal of Clinical Investigation**, v.105, p. 683-691, 2000.

TAKAZOE, K. et al. CD44-mediated neutrophil apoptosis in the rat. **Kidney International**, v.58, p. 1920-1930, 2000.

TAMARI, M. et al. Acceleration of Wound Healing with Stem Cell–Derived Growth Factors. **Oral & Craniofacial Tissue Engineering**, v.1, p. 181-187, 2011.

TANAKA, K. et al. Apatite-coated Hyaluronan for Bone Regeneration, **Journal of Dental Research**, v.7, n. 90, p. 906-911, 2011.

THOMAS, M.V.; PULEO, D.A.; Infection, Inflammation, and Bone Regeneration: a Paradoxical Relationship, **Journal of Dental Research**, v.9, n.90, p. 1052-1061, 2011.

THUNELL, D. H. et al. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. **Journal of Periodontal Research**, v.45, p. 148-152, 2009.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **Journal of Leukocyte Biology**, v.59, n.4, p. 505–511, 1996.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v.19, n.5, p. 641-644, 2003.

VIGETTI, D. et al. Proinflammatory Cytokines Induce Hyaluronan Synthesis and Monocyte Adhesion in Human Endothelial Cells through Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) and the Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). **Journal of Biology Chemistry**, v.285, p. 24639-24645, 2010.

VOLPI, N. et al. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p. 1718-1745, 2009.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death and Differentiation**, v.10, p. 45-65, 2003.

WEBER-NORDT, R.M.; MERAZ, M.A.; SCHREIBER, R.D. LPS-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts. **Journal of Immunology**, v.153, p. 3734-3744, 1994.

WELLS, C.A.; RAVASI, T.; HUME, D.A. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. **Journal of Leukocyte Biology**, v.78, p. 9-13, 2005.

YANG, X. et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. **Bone**, v.41, p. 928-936, 2007.

YOSHIMURA, A. et al. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v.15, p. 704-708, 2003.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nature Reviews of Immunology**, v.7, p. 454-465, 2007.

YUN, P.L.W. et al. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis*

major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. **Infection and Immunity**, v.69, n.9, p. 5650–5660, 2001.