

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

Gabrielly Ugoline Pereira

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE
SUPERFÍCIE EM MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LPS DE
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Belo Horizonte
2015

Gabrielly Ugoline Pereira

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE
SUPERFÍCIE EM MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LPS DE
*PORPHYROMONAS 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

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

P436e Pereira, Gabrielly Ugoline
Efeito do ácido hialurônico na expressão de moléculas de superfície em monócitos humanos estimulados com LPS de *porphyromonas gingivalis* / Gabrielly Ugoline Pereira. Belo Horizonte, 2015.
52 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. Monócitos. 3. Aderência Celular. 4. Comunicação celular. 5. Doença periodontal. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título. SIB PUC MINAS

CDU 616.311.2

Gabrielly Ugoline Pereira

EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE EM MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LPS DE *PORPHYROMONAS 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. Jeane de Fátima Correia Silva Alves – Newton Paiva
- 2- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 27 de agosto de 2015

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 12 de novembro de 2015

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, para meu crescimento e aprendizado.

Aos professores do curso Mestrado Profissionalizante em Implantodontia.

Aos funcionários da PUC Minas pelo apoio e atenção.

Aos meus pais, Humberto e Sueli, e minhas irmãs Grassiely e Giselly, e a minha vó Lourdes, pela colaboração, carinho e torcida.

Em especial,

Ao meu orientador Paulo Eduardo Alencar Souza pelas contribuições a este trabalho e à minha formação.

À Sheyla Neves pela parceria, cuidado e dedicação no auxílio na elaboração deste trabalho.

À doutoranda Luisa Mourão pelo apoio fundamental na execução das metodologias laboratoriais e a toda a equipe do Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LIBIC) do ICB/UFMG.

À Profa. Walderez Ornelas Dutra pelo apoio material e infraestrutura no LIBIC.

Aos amigos da Turma VII, Eduardo, Filipe, Flávio, Rafael e Thiago pelos momentos de alegria e aprendizado.

Agradeço a Deus, por conviver com pessoas tao especiais, que tanto me ajudaram no crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo da matriz extracelular que tem sido utilizado como adjuvante no tratamento da gengivite e da doença periodontal com resultados clínicos satisfatórios. Diversos estudos mostraram que o AH interfere em processos biológicos como inflamação, angiogênese, diferenciação celular e reparo tecidual. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do AH nas características fenotípicas e funcionais de células imunocompetentes estimuladas por produtos de periodontopatógenos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do AH na expressão de moléculas envolvidas na resposta imune em monócitos humanos estimulados *in vitro* por lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* (Pg-LPS). Para isso, células mononucleares de sangue periférico de nove indivíduos foram estimuladas com Pg-LPS e em seguida incubadas com AH. Por meio de reações de imunofluorescência e citometria de fluxo foi avaliada a expressão das moléculas CD11b, CD80, CD86 e HLA-DR na população de monócitos totais e fenotipicamente marcados para CD14. Os testes estatísticos ANOVA um critério com repetição e *post hoc* de Bonferroni mostraram que a adição de AH aumentou as frequências de monócitos CD14⁺ expressando CD11b e CD86 em relação ao grupo estimulado apenas com LPS. Além disso, aumentou também a intensidade de expressão de CD11b na população total de monócitos. Nossos resultados sugerem que AH pode afetar a co-estimulação de linfócitos T e a adesão de monócitos estimulados por LPS de *P. gingivalis*, uma vez que influencia a expressão de CD86 e CD11b.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. *Porphyromonas gingivalis*. Monócitos. Comunicação celular. Adesão celular.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA), a natural occurring glycosaminoglycan, has been recently used in the treatment of periodontal disease, and the clinical results are encouraging. In fact, several studies demonstrated that HA interferes with biological processes such as inflammation, angiogenesis and cell differentiation, thus influencing tissue repair. However, the impact of HA on phenotypic and functional characteristics of immunocompetent cells stimulated with oral pathogen products remains unclear. The aim of this study was therefore to evaluate the effect of HA on total monocytes, as well as CD14+ monocyte subpopulations, stimulated with lipopolysaccharide (LPS) derived from *Porphyromonas gingivalis*. Mononuclear cells from peripheral blood of nine healthy subjects were stimulated with *P. gingivalis* LPS and then incubated with HA. The surface expression of CD11b, CD80, CD86 and HLA-DR were quantified by flow cytometry. The incubation with HA increased the frequency of LPS-stimulated CD14+ monocytes expressing CD11b and CD86. It also increased the intensity of CD11b expression on total monocytes. Our data suggest that HA may affect T-cells costimulatory signaling and monocytes adhesion processes, as it alters the expression of CD11b and CD86 on monocytes exposed to *P. gingivalis* LPS.

Keywords: Hyaluronic acid. Lipopolysaccharides. *Porphyromonas gingivalis*. Monocytes. Cell adhesion molecules. Cell surface receptors

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Ácido hialurônico	13
1.2 Utilização clínica do AH	15
1.3 Moléculas de superfície celular envolvidas nas respostas imunoinflamatórias	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 ARTIGO	23
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERENCIAS.....	45
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas.....	51

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um componente da matriz extracelular que participa dos processos de migração e proliferação celular, influenciando ativamente o reparo tecidual (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010; TAMARI et al., 2011). Além disso, tem efeitos anti-inflamatório e bacteriostático (CAMPO et al., 2012; PIRNAZAR et al., 1999). Devido às suas propriedades biológicas, a aplicação clínica do gel de AH no tratamento periodontal tem sido objeto de intensa investigação (BOGAERDE, 2009). No entanto, a forma como o AH atua nos processos imunoinflamatórios do microambiente gengival ainda não foi completamente esclarecida. Assim, o conhecimento das características fenotípicas e funcionais de leucócitos expostos ao AH é importante para entender os eventos biológicos associados às suas propriedades clínicas. O presente estudo avaliou o efeito do AH na expressão de moléculas de superfície em monócitos estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Esse estudo visa contribuir para a melhor compreensão da ação do gel de AH no tratamento da doença periodontal.

1.1 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico foi descoberto em 1934 por Karl Meyer e John Palmer, na Universidade de Columbia, New York (VEDAMURTHY, 2004). Eles isolaram a substância a partir do humor vítreo de olho bovino. O AH é um polissacarídeo linear natural, biocompatível e hidrofílico (JIANG; LIANG; NOBLE, 2007; BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). O AH pode ser de alto peso molecular (3000-4000 kDa) ou de baixo peso molecular (20 kDa) (SADOWITS et al., 2012), pertencendo a um grupo de substâncias conhecidas como glicosaminoglicanas. Está presente no fluido sinovial, mesênquima embrionário, corpo vítreo, pele e muitos outros órgãos e tecidos do corpo humano (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010), ocorrendo principalmente na matriz extracelular do tecido conjuntivo. A concentração de ácido hialurônico livre no tecido é relativamente baixa. No entanto, os níveis de AH são drasticamente elevados quando rápida regeneração e proliferação celulares são requeridas, como na resposta à lesão tecidual e também durante a embriogênese (ASLAN; SIMSEK; DAYI, 2006).

Várias células possuem receptores de superfície para o AH, sendo o CD44 o mais significativo. Outros ligantes descritos são o RHAMM (receptor de AH de motilidade), HARE (envolvido com a endocitose) e LYVE-1 (expresso no endotélio linfático) (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Além disso, o AH também é capaz de interagir com os TLRs (*toll like receptors*) (JIANG; LIANG; NOBLE, 2007), podendo dificultar a ligação TLR/LPS, modulando assim a resposta inflamatória (CAMPO et al., 2012).

Através da sua interação com componentes da matriz e com células, o AH desempenha vários papéis biológicos. Atua na regulação da pressão osmótica e lubrificação dos tecidos (LAURENT et al., 1995), mantendo a integridade estrutural (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). A sua característica viscoelástica serve como barreira à difusão de macromoléculas (PISTORIUS et al., 2005), podendo assim retardar a penetração de vírus e bactérias (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Sua função varia desde ação puramente estrutural até a regulação gênica por meio da ligação a receptores celulares (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). A presença de AH facilita a migração e a diferenciação celular por meio da interação com fatores de crescimento presentes no interstício, favorecendo o processo de reparo do tecido danificado (TOOLE, 2001). Os efeitos do AH estão associados ao seu tamanho molecular (FERGUSON et al., 2011), pois o número de unidades funcionais da molécula confere propriedades biológicas distintas, devido à ativação de diferentes vias de transdução de sinais celulares. Moléculas de AH de alto peso molecular, por exemplo, têm função de preenchimento tecidual e exibem ação antiinflamatória. Já moléculas de AH de até 20 MDa estão envolvidas na ovulação, embriogênese e angiogênese (DICKER et al., 2014). Durante o processo inflamatório, já foi descrito que o AH de alto peso molecular tem ação moduladora, podendo alterar a biodisponibilidade de mediadores inflamatórios e enzimas secretadas na matriz extracelular (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Além disso, tem efeito protetor contra radicais livres, capazes de danificar células e perpetuar o processo inflamatório (PRESTI; SCOTT, 1994).

As excelentes propriedades físicas, químicas e biológicas do AH encorajaram a investigação do seu uso no tratamento reparador tecidual e os resultados tem sido promissores.

1.2 Utilização clínica do AH

O gel de AH tem sido utilizado na área médica para o tratamento de diversas doenças inflamatórias (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Na odontologia, o AH é amplamente utilizado no tratamento de feridas e inflamações na mucosa bucal, além da doença periodontal (NOBRE; CARVALHO; MALO, 2009; NOLAN et al., 2006; PARK et al., 2010; PISTORIUS et al., 2005).

Diversos estudos avaliaram os efeitos clínicos da utilização do ácido hialurônico como adjuvante no tratamento da gengivite e periodontite. A aplicação clínica na forma de membranas e géis de AH durante a terapêutica cirúrgica pode reduzir a contaminação bacteriana no local da ferida, diminuindo o risco de infecção, e promover a regeneração tecidual de modo mais previsível (PADMA et al., 2013). Chauhan et al. (2013) avaliaram os efeitos do AH como adjuvante nos procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) durante tratamento da periodontite crônica. Seus resultados preliminares mostraram que o uso de gel de AH e de clorexidina pode melhorar significativamente os benefícios clínicos da RAR.

Bogaerde (2009) investigou a eficácia clínica do AH para tratamento de defeitos periodontais profundos. Após alisamento radicular, o AH na forma de fibras foi colocado para preencher completamente os espaços do defeito ósseo. Um ano após o tratamento, foi observada redução da profundidade de bolsa periodontal e ganho de inserção.

Pilloni et al. (2011) avaliaram a eficácia de um biogel a base de AH no tratamento periodontal. Foram avaliados parâmetros como diminuição de sangramento, redução de profundidade à sondagem, redução do índice de placa e ganho de inserção. Os pacientes foram devidamente instruídos sobre a higienização diária e avaliados após 7, 14 e 21 dias. Em todos os fatores avaliados obteve-se melhores resultados no grupo tratado com AH e não foram relatadas reações adversas. Assim, foi possível concluir que o tratamento com AH reduz a inflamação gengival e melhora os parâmetros clínicos periodontais.

Brigúglio et al. (2013), em um estudo randomizado, avaliaram o efeito da utilização de AH (Hyaloss matrix, Meta G.C.M) para tratamento dos danos causados pela periodontite. Foram selecionados 40 pacientes com defeitos infra-osseos periodontais de duas paredes. Os defeitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: sítios tratados com AH e sítios tratados com cirurgia de retalho, e

observados por um período de 24 meses. Avaliações clínicas e radiográficas revelaram que o tratamento com AH ofereceu benefícios estatisticamente significativos quanto à profundidade de sondagem e ao nível clínico de inserção.

Eick et al. (2013) descreveram o efeito da aplicação do gel de AH em pacientes com periodontite. Eles observaram variáveis clínicas e também o infiltrado bacteriano subgingival. Foram selecionados 34 indivíduos. No grupo teste (n = 17), o gel de AH foi aplicado durante as primeiras 2 semanas após a raspagem e alisamento radicular. O grupo controle (n = 17) foi tratado apenas com raspagem e alisamento radicular. Profundidade de sondagem e nível de inserção foram avaliados por um período de 6 meses. Em ambos os grupos houve benefício significativo nos parâmetros clínicos, sendo que no grupo tratado com AH os resultados foram ainda melhores. A contagem de bactérias após o período de 6 meses foi significativamente reduzida no grupo teste, enquanto no grupo controle *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* tiveram seu número aumentado. Portanto, a aplicação de gel AH como adjuvante no tratamento periodontal pode ter efeitos positivos em parâmetros clínicos, além de dificultar a recolonização por periodontopatógenos.

Fawzy et al. (2012) avaliam clinicamente o efeito da aplicação local de gel de AH em conjugação com a cirurgia periodontal. Quatorze pacientes com periodontite crônica foram incluídos neste estudo. Após terapia periodontal não cirúrgica inicial e reavaliação, realizou-se cirurgia utilizando a técnica Widman modificado (MWF) associada à aplicação local de gel. No grupo teste foi aplicado gel de AH a 0,8% (Gengigel, Ricerfarma, Milan, Italy), enquanto no grupo controle foi aplicado placebo. Os grupos foram avaliados logo após a cirurgia e após 3 e 6 meses. Os parâmetros utilizados foram nível de inserção clínica, profundidade da bolsa, recessão gengival, índice de sangramento e índice de placa. Observou-se uma diferença estatística significativa 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 parâmetros não mostraram diferença estatística significativa.

Mesa et al. (2002) avaliaram clínica e histologicamente o efeito do gel de AH no tratamento da periodontite. Um desenho de boca dividida foi utilizado, aplicando-se aleatoriamente o gel para um quadrante e um placebo para a contralateral. Foram realizadas biópsias gengivais em 28 pacientes com doença periodontal. Os autores concluíram que o gel de AH reduz a proliferação celular de fibroblastos e linfócitos,

diminui o processo inflamatório, e propicia melhora clínica em pacientes com periodontite.

1.3 Moléculas de superfície celular envolvidas nas respostas imunoinflamatórias

O sistema imune é composto de duas subdivisões principais: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. O sistema imune inato consiste na primeira linha de defesa contra microrganismos enquanto que o sistema imune adaptativo age como uma segunda linha de defesa e também protege contra nova exposição ao mesmo patógeno. As células características da resposta inata são os monócitos/macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e células *natural killer*. Durante a resposta imune adaptativa, incluem-se os linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT) ao conjunto celular presente no tecido afetado (CRUVINEL et al., 2010).

A inflamação é um processo complexo associado à resposta imunológica. Inicialmente, a alteração da microcirculação possibilita o extravasamento de plasma e a diapedese de leucócitos para o tecido agredido (BRASILEIRO-FILHO, 2009). No sítio inflamatório, as células imunocompetentes desempenham atividades biológicas próprias, que são dependentes da comunicação intercelular. Na inflamação aguda, predominam elementos da resposta imune inata, sendo as principais células os neutrófilos e macrófagos. Na inflamação crônica, em geral ocasionada pela persistência do estímulo agressor, o processo inflamatório se mantém e sofre mudanças qualitativas, ocorrendo alteração progressiva nos elementos celulares e solúveis que infiltram a região afetada (ABBAS; LICHTMAN, 2007). O tecido apresenta um infiltrado composto principalmente por células mononucleares (macrófagos e linfócitos), além de indícios de angiogênese e fibrose (CRUVINEL et al., 2010). A permanência do agente agressor leva à cronificação do processo, havendo concomitância de destruição e reparo teciduais, onde o desequilíbrio leva à perda de tecido. Um exemplo clássico é a periodontite. As alterações patológicas que caracterizam as manifestações clínicas dessa doença são, em grande medida, resultado da resposta inflamatória crônica (YUCELL-LINDBERG; BAGE, 2013). Na doença periodontal, portanto, a inflamação é responsável não só pela proteção, mas também pelo dano causado ao periodonto.

As células da resposta imune inata possuem receptores de reconhecimento capazes de identificar padrões moleculares gerais encontrados nos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs). O LPS é um componente da membrana das bactérias gram-negativas e um exemplo clássico de PAMP. Entre os periodontopatogenos, encontra-se o *P. gingivalis*, bactéria altamente virulenta, gram-negativa e intimamente associada à periodontite (MYSAK et al., 2014). O LPS derivado de *P. gingivalis* (Pg-LPS) é capaz de ativar o sistema imune, estimulando a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, e a expressão de moléculas de superfície (DARVEAU et al., 2004).

Macrófagos e células dendríticas são células apresentadoras de antígeno (APC) profissionais que monitoram continuamente o ambiente através da internalização de partículas e produtos solúveis (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Essas células são responsáveis por conectar o sistema imune inato ao adaptativo ao tornar o antígeno “visível” para o linfócito T (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Uma característica das APCs é a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade-II (MHC-II), dentre elas o HLA-DR. A sensibilização dos LT auxiliares requer a interação entre o seu receptor (TCR) e o complexo antígeno-MHC presente nas APCs (ABBAS; LICHTMAN, 2007). O aumento da intensidade de expressão da HLA-DR é um indicativo de ativação de APCs (RAZMA et al., 1984; STIEHM et al., 1984) e, em tecidos gengivais saudáveis, sua expressão não é frequente (BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2001).

Além da ligação do complexo antígeno-MHC ao TCR, os LT necessitam de um segundo sinal, dado por moléculas co-estimulatórias, para que ocorra sua ativação e a resposta seja otimizada. A via co-estimulatória mais conhecida corresponde à ligação das moléculas da família B7 (B7-1 e B7-2) nas APCs às moléculas da família CD28 (CD28 e CTLA-4) nos LT (WANG; CHEN, 2004). A ligação das B7 ao CD28 estimula a ativação de LT, a produção de citocinas e impede o estado de energia (LINSEY; LEDBETTER, 1993). A ligação ao CTLA-4 tem característica inibitória, regulando o acesso de CD28 aos ligantes B7 (WALKER; SANSOM, 2015). O fato de CD28 e CTLA-4 dividirem os mesmos 2 ligantes, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), levanta a questão sobre a capacidade estimulatória e inibitória dessas moléculas (SANSOM; MANZOTTI; ZHENG, 2003). CD80 e CD86 são glicoproteínas da membrana estruturalmente semelhantes e estão ausentes ou expressas em níveis baixos nas APCs em repouso (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI,

2008). Durante o processo de ativação, essas moléculas passam a ser expressas na superfície celular (SOUZA et al., 2007). Em geral, a expressão de CD86 é mais abundante do que a de CD80 (MANZOTTI et al., 2006). Por outro lado, CD80 parece ter maior avidéz de ligação a ambos os receptores, quando comparado ao CD86 (WALKER; SANSOM, 2015), fato que poderia compensar a sua menor expressão. Um estudo realizado por FIELDS et al. (1998) indicam que a ligação do CD80 ao CD28 é mais potente em termos de capacidade de ativação celular, quando comparada a CD86. Interessantemente, CD80 e CD86 tem maior afinidade pelo CTLA-4 (LINSLEY et al., 1994; van der MERWE, 1997). Sabendo-se que CTLA-4 se liga aos mesmos ligantes de CD28, mas com maior avidéz, pode-se ponderar que esse sistema opera de forma integrada (WALKER AND SANSOM, 2015). Sendo assim, o equilíbrio entre a expressão de CD28 e CTLA-4 nos LT e a expressão de CD80 e CD86 na superfície das APCs parece ser fundamental para o controle da intensidade e duração da resposta imunológica.

Macrophage antigen-1 (Mac-1, CD11b/CD18) é um importante membro das integrinas $\beta 2$, moléculas de adesão expressas na superfície de leucócitos (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2008). Seus ligantes são intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) e ICAM-2 (ALTIERI; EDGINGTON, 1998). Mac-1 desempenha papel importante no processo de recrutamento leucocitário, interagindo com seus receptores no endotélio vascular (ALTIERI; EDGINGTON, 1998; DIAMONT et al., 1990; ALTIERI et al., 1990). Uma vez estabelecida a ligação estável, monócitos e neutrófilos podem responder ao estímulo quimiotático provido por mediadores solúveis, atravessando a parede das vênulas e dirigindo-se para o sitio inflamatório (NIELSEN et al., 1994). Mac-1 participa também do processo de locomoção dos leucócitos na matriz extracelular por meio da interação com diversos tipos de ligantes, tais como fibronectina, colágeno e laminina (THOMPSON; MATSUSHIMA, 1992; SMITH et al., 1989). O processo de ativação celular modifica o perfil de moléculas de adesão expressas pelas células (MARLIN; SPRINGER, 1987; STAUNTON; DUSTIN; SPRINTER, 1989). Seu papel na migração de linfócitos não é claro, mas foi demonstrado que CD11b também é expresso na superfície de células T CD8⁺, onde atua na migração celular (KAWAI et al., 2004).

Moléculas de superfície como a HLA-DR, CD80, CD86 e CD11b auxiliam nos processos de migração celular e na conexão entre a resposta imune inata e adaptativa. Ademais, são extremamente importantes no estabelecimento e

manutenção de interações celulares. Portanto, a expressão diferencial dessas moléculas pode constituir um fator importante na determinação da ação biológica do AH no processo imunoinflamatório periodontal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido hialurônico na expressão de moléculas de superfície envolvidas na resposta imune por monócitos humanos, *in vitro*, estimulados por lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis*.

2.2 Objetivos específicos

- a) determinar a frequência de monócitos expressando CD80, CD86, HLA-DR e CD11b após estimulação com LPS de *P. gingivalis* e após incubação com ácido hialurônico, comparando entre os grupos;
- b) determinar a frequência de monócitos fenotipicamente identificados pelo marcador CD14, expressando CD80, CD86, HLA-DR e CD11b após estimulação com LPS de *P. gingivalis* e após incubação com ácido hialurônico, comparando entre os grupos.

3 ARTIGO

Ácido hialurônico altera a expressão de moléculas de superfície em monócitos humanos estimulados com LPS de *P. gingivalis*

Os resultados desse trabalho foram compilados na forma de artigo a ser submetido à revista *European Journal of Oral Sciences* (Qualis B1). O texto encontra-se na língua portuguesa e, após considerações da banca, será redigido na língua inglesa, de acordo com as normas do periódico, que podem ser acessadas em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)16000722/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)16000722/homepage/ForAuthors.html).

Hyaluronic acid changes the expression of surface molecules in human monocytes stimulated with lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*

Gabrielly U. Pereira^a, Sheyla V. Omonte^a, Luisa M.D. Magalhães^b, Walderez O. Dutra^b, Kenneth J. Gollob^c, Tarcília A. Silva^d, Martinho C.R. Horta^a, Paulo E.A. Souza^a.

^aPostgraduate Program in Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^bDepartment of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^cPostgraduate Program in Medicine and Biomedicine, Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^dPostgraduate Program in Dentistry, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author: Paulo Eduardo Alencar 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. Brazil. CEP: 30535-901.

Phone number: +55 31 3319-4414

Telefax number: +55 31 3319-4415

E-mail: pauloalencar@pucminas.br

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a glycosaminoglycan that occurs naturally and has been used as an adjuvant in the treatment of gingivitis and of periodontal disease with satisfactory clinical results. Several studies have shown that HA interferes with biological processes such as inflammation, angiogenesis, cell differentiation and tissue repair. However, little is known about the effect of HA on phenotypical and functional characteristics of immunocompetent cells stimulated by periodontopathogen products. The objective of this study is to evaluate the effect of HA on the expression of molecules involved in the immune response by human monocytes stimulated *in vitro* by lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* (Pg-LPS). Thus, mononuclear cells of peripheral blood of nine individuals were stimulated with Pg-LPS and then incubated with HA at 0.2%. By means of immunofluorescence reactions and flow cytometry, the expression of molecules CD11b, CD80, CD86 and HLA-DR was evaluated in the population of total monocytes and those phenotypically labeled for CD14. Statistical tests, ANOVA, a criterion of repetition, and Bonferroni *post hoc* have shown that the addition of HA increased the frequencies of CD14⁺ monocytes expressing CD11b and CD86 when compared to the group stimulated only with LPS. Moreover, it increased the intensity of the expression of CD11b in the total population of monocytes. Our results have suggested that HA may affect the costimulation of T lymphocytes and the adhesion of monocytes stimulated by LPS of *P. gingivalis*, once it plays a role in the expression of CD86 and CD11b.

Keywords: hyaluronic acid; *Porphyromonas gingivalis*; Monocytes; Co-stimulation; adhesion molecules.

Introduction

The periodontal disease is a chronic inflammatory condition of infectious nature, which affects protective and support periodontal tissues, affecting most of the world population. This inflammation represents a response of the organism facing the bacterial attack. Although several periodontopathogens are able to directly damage the host's tissue, tissue damage occurs mainly due to the inflammatory process resulting from this aggression (1). Therefore, immunocompetent cells play a fundamental role in the pathogenesis of the periodontal disease, because, although they act as a protective factor, they may also act in the destructive process of the periodontium (2). In the periodontal disease, the persistence of the aggressive bacterial stimulation maintains the chronic inflammatory state, which includes immunocompetent cells such as macrophages and lymphocytes (3). The identification of microbial products by macrophages and dendritic cells leads to the cell activation and increase in the expression of surface molecules such as HLA-DR, CD80, CD86, CD40 and CD11b, which help in the cell migration and activation and in the link between innate and adaptive immune responses (4,5). These molecules serve as potent co-stimulators for the activation and function of lymphocytes (4,5).

The treatment of the periodontal disease aims at controlling bacterial contamination and repairing tissues that were damaged during the pathological process (6,7). In order to be more effective, new techniques and products have been suggested, among which is the local application of hyaluronic acid (HA) (8). Hyaluronic acid is a linear polysaccharide, which occurs naturally, is biodegradable, biocompatible and highly hydrophilic (9). Although it is a simple polysaccharide, it has several biological functions triggered by means of its binding to cell surface receptors, activating signaling pathways, which regulate cell adhesion, migration,

proliferation and differentiation (10). Molecules of HA may have different molecular weights according to the number of functional molecular units. The difference of molecular size confers distinct biological properties, due to the activation of different cell signal transduction pathways (11). In its native form, HA with a high molecular weight promotes tissue repair, in addition to having bacteriostatic and anti-inflammatory properties (10,12,13). Therefore, applying an HA gel may help in tissue healing.

Recent studies obtained positive results by using HA gel as an adjuvant in the treatment of the periodontal disease. Some authors have seen an increase in the conjunctive insertion when HA was associated with the surgical treatment (14,15). Other studies had better results when associating the addition of HA to root scaling and planing (16,17,18). Similarly, some authors have shown an advantage in the topical administration of HA in the treatment of gingivitis and periodontitis (19,20). Other authors (8) verified that the use of an esterified HA, as fibers, increased the effectiveness of the treatment of deep periodontal defects, reducing the periodontal pocket depth and insertion gain. Furthermore, the clinical application of HA during surgery may induce the bacterial contamination at the wound site, reducing the risk of infection and promoting tissue regeneration more predictably (21).

Although several studies have shown that desired clinical results associated with the use of HA may help in the treatment of the periodontal disease, its effect in immunoinflammatory mechanisms has not been elucidated yet. Thus, the objective of the present study was to analyse the influence of HA in the frequency and intensity of the expression of surface molecules HLA-DR, CD80, CD86 and CD11b by human monocytes stimulated by Pg-LPS. Results from this investigation suggest that HA may affect the co-stimulation of T lymphocytes and the adhesion of monocytes

stimulated by LPS of *P. gingivalis*, by means of stimulating the expressions of CD86 and CD11b.

Material and Methods

Approval by the Research Ethics Committee

This study was approved by the Research Ethics Committee of “Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais”, Belo Horizonte, Brazil (CAAE: 22097313.0.0000.5137).

Cultures of PBMC with *P. gingivalis* and hyaluronic acid

Nine adult individuals without the disease and with no use of medicines able to interfere with the immunoinflammatory response were recruited for this study. Twenty mL of blood were collected from each individual and stored in heparinized *vacutainer* tubes (Beckton & Dickinson). Immediately afterwards, blood was diluted in phosphate buffered saline (PBS) in a ratio of 1:1 and applied on 10mL of Ficoll-Paque (Pharmacia). After centrifugation for 40 minutes, 200g, at 20°C, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected and washed 3 times with PBS. After counting in the hemocytometer chamber, CMSP were resuspended for 1.5×10^6 cells/mL in a complete medium: Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich), 2mM of L-glutamine, 100UI/mL of penicillin G potassium, 100µg/mL of streptomycin and 5% of normal human serum. Cells were transferred to 4mL polypropylene tubes and submitted to three treatments: 1) Control; 2) LPS and 3) LPS+HA. In the control group, CMSP were maintained in complete RPMI. In groups LPS and LPS+HA, CMSP were incubated for 6 hours in an incubator at 36°C and 5% of CO₂, with 200ng/mL of lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis*

(Lot# LPG 34-23) (InvivoGen, San Diego, CA, USA). Then, hyaluronic acid with a high molecular weight was added in the LPS+HA group (Jiangxi Pharmaceutical Group Corporation - JXPGC, Jiangxi, China) at a final concentration of 0.2% in culture. Thus, CMSP remained for over 20 hours in culture.

Immunofluorescence reactions and flow cytometry

For immunofluorescence reactions, a protocol similar to that described by other authors was used (22). After different treatments, 2×10^5 CMSP were transferred to each well of a 96-well U-bottom plate and washed with PBS. Then, combinations of monoclonal antibodies were added diluted in PBS 0.015M, pH 7.4, containing 1mM azide and 0.25% of bovine serum albumin (BSA): anti-CD14 bv421 (clone M5E2, BioLegend), anti-CD80 PE Cy-7 (clone 2D10, Biolegend), anti-CD86 PE Cy-5 (clone IT2.2, eBioscience), anti-CD11b FITC (clone ICRF44, eBioscience) and anti-HLA-DR FITC (clone G46-6, BD Pharmingen). After 15 minutes of incubation at 4°C, cells were washed with PBS and resuspended in PBS buffer with 2% of formaldehyde, 0.5% of BSA and 2mM azide. For all immunofluorescence reactions, isotype controls (negative controls) were added conjugated with the same fluorochromes used for labelings.

In order to obtain cytometric data a flow cytometer FACSCanto™II was used (Becton Dickinson, New Jersey, USA), obtaining data from 70,000 cells in each tube analysed. By means of a chart of size *versus* granularity, a population of monocytes was selected. Within this selected population, the population of CD14 positive was determined. Then, positive cells were quantified for each surface antigen evaluated in the total population of monocytes and in the populations of CD14+ and CD14- monocytes, with results being expressed in percentage. Intensities of

immunolabeling of surface molecules in the total population of monocytes and results were expressed as mean intensity of fluorescence (MIF) emitted. All cytometric analyses were carried out using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc., USA).

Statistical Analysis

Tests of D'Agostino and of Pearson have shown the normal distribution of data. Thus, ANOVA test, a criterion with repetition, followed by Bonferroni *post hoc* test were used in order to evaluate whether there are differences among the groups evaluated, with a level of significance of 5%. Analyses were carried out by means of the software GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA).

Results

By evaluating the expression of the costimulatory molecule CD80 in the population of monocytes selected, verified that the total frequency of CD80+ cells was significantly higher in groups LPS and LPS+HA when compared to the control group (Table 1). The same was observed when separately analysing subpopulations of CD14+ and CD14- monocytes (Table 1). Analysis of the intensity of the expression of CD80 in the population of total monocytes was also larger in the treated groups than in the control group (Table 2). Incubation with HA has not affected significantly the frequency or the intensity of the expression of CD80 when compared to the group only stimulated with LPS of *P.gingivalis*.

Results for the expression of CD86 have shown that the incubation with LPS and with LPS+HA significantly reduced frequencies of CD86+ cells both in the population of total monocytes and in the subpopulation of CD14 negative monocytes (Table 1). The same occurred with the intensity of the expression of CD86 in these

two populations evaluated (Table 2). Although the incubation with LPS has also reduced significantly the frequencies of CD86+ cells in the subpopulation of CD14+ monocytes when compared to the control group, the addition of HA has increased the frequency of these cells when compared to the group stimulated only with LPS. However, frequencies of CD86+ cells within the subpopulation of CD14- monocytes continued significantly lower in the group treated with HA than in the control group (Table 1).

The frequency of total monocytes expressing HLA-DR was significantly lower than that in groups LPS and LPS+HA when compared to the control group, whereas the intensity of expression of this molecule was similar among the groups evaluated (Table 2). Although frequencies of HLA-DR+ cells in the subpopulation of CD14+ monocytes have been similar among different groups, the analysis of the subpopulation of CD14 negative monocytes showed that the group LPS+HA had a lower frequency of cells expressing HLA-DR than the control group (Table 1).

Analysis of adhesion molecule expression CD11b has shown that there were no significant differences in total frequencies of monocytes expressing this molecule (Table 1). Analysis of molecule expression intensity (MIF) in total monocytes has shown that the incubation with LPS reduced the intensity of the expression of CD11b, whereas the incubation with HA reversed this situation, returning to similar levels to those of the control group (Table 2). By analysing subpopulations of monocytes differently labeled for CD14, we verified that the incubation with LPS reduced the frequencies of CD14+ monocytes expressing CD11b, whereas the addition of HA increased this molecule in the CD14+ subpopulation at similar levels of those of the control group (Table 1). In the subpopulation of CD14 negative monocytes, the

incubation with LPS+HA increased the frequency of cells expressing CD11b when compared to the control group (Table 1).

Discussion

Knowledge in the phenotypic and functional characteristics of leukocytes exposed to HA is important to understand biological events associated to their clinical properties. It has already been shown that HA is able to affect leukocytes, changing the production of cytokines (23,24).

Data obtained in the present study have shown that the frequency and intensity of the expression of molecule CD80 was increased by the incubation with Pg-LPS, in all populations of the monocytes studied. On the other hand, HA has not changed the frequency of expression or mean intensity of the expression of this molecule on the monocytes previously stimulated by LPS. In the analysis of the expression of CD86 in monocytes stimulated by Pg-LPS, a lower frequency of expression of this molecule was shown when compared to the control. The incubation with HA reverted this situation, increasing the frequency of the expression of CD86 in the CD14+ subpopulation. It is interesting to observe that in the present study, the frequency of cells immunolabelled for CD80 was smaller than that for CD86 in all groups studied, as reported by other authors (27).

Several studies highlight the importance of CD80 and CD86 in the lymphocyte co-stimulation (7,28,29). The interaction of these molecules with their ligands CD28 and CTLA-4 in T lymphocytes provides necessary signs to control lymphocyte activation (7). Molecules CD80 and CD86 are proteins found on the surface of antigen-presenting cells (APCs), such as macrophages and dendritic cells (30,31). Whereas the link to CD28 consists of an important co-stimulation for the activation

and differentiation of naive T lymphocytes, the link to CTLA-4 has an immunoregulatory nature, by inhibiting the activity of T lymphocytes previously stimulated by the antigen recognition (32,33). Molecule CD86 has a greater affinity for the CTLA-4 surface receptor than that by CD28 (33). By increasing the levels of CD86 in monocytes stimulated by LPS of *P. gingivalis* without, however, significantly changing the expression of CD80, HA might contribute to inhibit the activation of T lymphocytes in the periodontal site, reflecting on less inflammation and a better control of tissue destruction. On the other hand, a study carried out by some authors (34) has shown that HA increases the expression of CD80 and CD86 in dendritic cells, causing the induction of a greater proliferation of T lymphocytes. The study of phenotypical and functional characteristics of T lymphocytes stimulated by products of periodontopathogens is required to verify levels of expression of CD28 and CTLA-4 receptors, as well as the effects of changes in the expression of CD86 in monocytes induced by HA in the production of cytokines by these lymphocytes.

We have also analysed the influence of LPS-Pg and of HA on the expression of HLA-DR in monocytes. This molecule is part of the major complex of human histocompatibility II (MHC II) present on the surface of APCs (35). MHC is involved in the antigen presentation to T lymphocyte. The sensitization of T lymphocyte requires the interaction between its receptor (TCR) and the MHC-antigen complex present in APCs (36). This is the first sign to start the lymphocyte activation. Therefore, this marker may be of particular interest to evaluate the cell immunoregulation. Our results have shown that Pg-LPS reduces the expression of HLA-DR in total monocytes. The increase of the expression of HLA-DR might be associated with the activation of APCs (37,38). However, it has already been shown that the stimulation of monocytes by parasites and their products reduces the expression of HLA-DR

(22). The reduction of the expression of HLA-DR in monocytes stimulated by LPS-Pg might reduce the microbial antigen presentation to CD4⁺ T lymphocytes, changing the cell acquired immune response in periodontal sites. HA was not able to reverse the reduction of the expression of HLA-DR. Further studies are required to analyse functional characteristics of lymphocytes co-cultivated with monocytes stimulated by Pg-LPS and to analyse the possible modulation of the lymphocyte activity by the presence of HA.

A previous study showed a great expression of ICAM-1 adhesion molecule by endothelial cells in periodontally compromised sites, suggesting the participation of this molecule in the balance between health and periodontal disease (39). Therefore, we have decided to evaluate the expression of ICAM-1 ligand, CD11b, in monocytes stimulated by Pg-LPS and HA. CD11b belongs to the family of integrins and is expressed on the surface of leukocytes. It functionally regulates cell adhesion and migration during inflammatory response (40). In our study, although no significant difference was observed in the frequency of total monocytes expressing CD11b after incubation with LPS or with LPS+HA, intensity of expression (MIF) of this molecule was significantly reduced by LPS-Pg. The addition of HA significantly reverted the reduction of intensity of expression of CD11b. When analyzing the subpopulation of CD14⁺, we have also verified reduced frequencies of cells expressing CD11b after incubation with LPS-Pg and reversion of this effect after adding HA. The addition of HA in the subpopulation of CD14⁻ monocytes also increased the frequency of CD11b⁺ cells, when compared to the control group. This set of effects observed after incubation with HA may contribute to a larger recruitment of monocytes for periodontal sites, helping to fight the aggressive agent. In a recent literature review, some authors (41) suggested that the addition of HA stimulates the movement of

leukocytes from blood vessels to several tissues. Thus, HA may change the cell migration due to its interaction with its CD44 surface receptor. Our results support this hypothesis, since HA stimulated greater expression of the CD11b molecule on the cell surface of CD14+ monocytes, and this molecule is also associated with cell migration.

In our experiment, HA was used at a concentration of 0.2% with microbial stimulation by LPS of *P. gingivalis*. Further experiments in immunoinflammatory environments stimulated by microbial products of different periodontopathogens and for different times are necessary to determine the role played by HA in the cell signaling and its consequences in the pathogenesis of the periodontal disease.

In conclusion, according to our results, HA was able to change the expression of surface molecules CD86 and CD11b in human monocytes stimulated by LPS of *P. gingivalis*. These molecules are important mediators of lymphocyte activation and of leukocyte recruitment, influencing effector mechanisms of innate and cell immunity. Thus, changes in the expression of these molecules might change signalling pathways mediated by immunocompetent cells, modulating the evolution of the periodontal disease.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. WOD, KJG and TAS are CNPq fellows. SVO and LMDM are CAPES fellows.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. BAKER PJ, HOWE L, GARNEAU J, ROOPENIAN DC. T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; **34**: 45-50.
2. TAUBMAN MA, VALVERDE P, HAN X, KAWAI T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 2005; **76**: 2033-2041.
3. YUCEL-LINDBERG T, BAGE T. Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontitis. *Expert Rev Clin Immunol* 2013; **15**: e7.
4. CAUX C, MASSACRIER C, VANBERVLIET B, DUBOIS B, VAN KOOTEN C, DURANDI I. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994; **180**: 1263-1272.
5. BANCHEREAU J, PULENDRAN B, STEINMAN R, PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Rev Immunol* 2000; **18**: 767-811.
6. LINDHE J, WESTFELT E, NYMAN S, SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; **11**: 448-458.
7. WANG S, CHEN L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* 2004; **1**: 37-42.
8. BOGAERDE LV. Treatment of infrabony periodontal defects with esterified hyaluronic acid: clinical report of 19 consecutive lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009; **29**: 315-323.
9. FERGUSON EL, ROBERTS JL, MOSELEY R, GRIFFITHS PC, THOMAS DW. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments. *Int J Pharm* 2011; **420**: 84-92.
10. JIANG D, LIANG J, NOBLE PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 435-461.
11. DICKER KT, GURSKI LA, PRADHAN-BHATT S, WITT RL, FARACH-CARSON MC, JIA X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater* 2014; **10**: 1558-1570.
12. CAMPO GM, AVENOSO A, D'ASCOLA A, PRESTIPINO V, SCURUCHI M, NASTASI G, CALATRONI A, CAMPO S. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. *Biofactors* 2012; **38**: 69-76.

13. PIRNAZAR P, WOLINSKY L, NACHNANI S, HAAKE S, PILLONI A, BERNARD GW. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol* 1999; **70**: 370-374.
14. BRIGUGLIO F, BRIGUGLIO E, BRIGUGLIO R, CAFIERO C, ISOLA G. Treatment of infrabony periodontal defects using a resorbable biopolymer of hyaluronic acid: a randomized clinical trial. *Quintessence Inter Periodontol* 2013; **44**: 231-240.
15. FAWZY EL-SAYED KM, DAHABA MA, ABOUL-ELA S, DARHOUS MS. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig* 2012; **16**: 1229-1236.
16. EICK S, RENATUS A, HEINICKE M, PFISTER W, STRATUL SI, JENTSCH H. Hyaluronic acid as an adjunct after scaling and root planing: a prospective randomized clinical trial. *J Periodontol* 2013; **84**: 941-949.
17. JOHANNSEN A, TELLEFSEN M, WIKESJÖ U, JOHANNSEN G. Local delivery of hyaluronan as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; **80**: 1493-1497.
18. CHAUHAN AS, BAINS VK, GUPTA V, SINGH GP, PATIL SS. Comparative analysis of hyaluronan gel and xanthan-based chlorhexidine gel, as adjunct to scaling and root planing with scaling and root planing alone in the treatment of chronic periodontitis: a preliminary study. *Contemp Clin Dent* 2013; **4**: 54-61.
19. SAHAYATA VN, BHAVSAR NV, BRAHMBHATT NA. An evaluation of 0.2% hyaluronic acid gel (Gengigel ®) in the treatment of gingivitis: a clinical & microbiological study. *Oral Health Dent Manag* 2014; **13**: 779-785.
20. MESA FL, ANEIROS J, CABRERA A, BRAVO M, CABALLERO T, REVELLES F, DEL MORAL RG, O'VALLE F. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. *Histol Histopathol* 2002; **17**: 747-753.
21. PADMA R, DIVYA N, CHETAN SK, LAKSHMAYYA ND. Hyaluronic acid – a simple, unusual polysaccharide: a potential mediator for periodontal regeneration. *J Dent* 2013; **3**: 113-119.
22. SOUZA PE, 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**: 312-317.

23. 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* 2014; **102**: 305-314.
24. YASUDA T. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF-kappaB via ICAM-1. *Inflamm Res* 2007; **56**: 246-253.
25. MYSAK J, PODZIMEK S, SOMMEROVA P, LYUYA-MI Y, BARTOVA J, JANATOVA T, PROCHAZKOVA J, DUSKOVA J. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res* 2014; **2014**: 476068.
26. DARVEAU RP, PHAM TT, LEMLEY K, REIFE RA, BAINBRIDGE BW, COATS SR, HOWALD WN, WAY SS, HAJJAR AM. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun* 2004; **72**: 5041-5051.
27. MANZOTTI CN, LIU MK, BURKE F, DUSSABLY L, ZHENG Y, SANSOM DM. Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 1413-1422.
28. WALKER LS, SANSOM DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol* 2015; **36**: 63-70.
29. SANSOM DM, MANZOTTI CN, ZHENG Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol* 2003; **24**: 313-318.
30. FIELDS PE, FINCH RJ, GRAY GS, ZOLLNER R, THOMAS JL, STURMHOFEL K, LEE K, WOLF S, GAJEWSKI TF, FITCH FW. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. *J Immunol* 1998; **161**: 5228-5275.
31. OLSSON C, MICHAELSSON E, PARRA E, PETTERSSON U, LANDO PA, DOHLSTEN M. Biased dependency on CD80 versus CD86 in the induction of transcription factors regulating the human IL-2 promoter. *Int Immunol* 1998; **10**: 499-506.
32. LINSLEY PS, GREENE J, TAN P, BRAD SJ, LEDBETTER JA, ANASETTI C, DAMLE NK. Coexpression and functional cooperativity of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992. [In press].
33. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; **1**: 793-801.

34. DO Y, NAGARKATTI PS, NAGARKATTI M. Role of CD44 and Hyaluronic Acid (HA) in Activation of Alloreactive and Antigen-Specific T Cells by Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *J Immunother* 2004; **27**: 1-12.
35. BISSON-BOUTELLIEZ C, MILLER N, DEMARCH D, BENE MC. CD9 and HLA-DR expression by crevicular epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001; **28**: 650-656.
36. JANEWAY JR CA, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 197-216.
37. RAZMA AG, LYNCH JP, WILSON BS, WARD PA, KUNKEL SL. Expression of Ia-like (DR) antigen on human alveolar macrophages isolated by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984; **129**: 419-424.
38. STIEHM ER, SZTEIN MB, STEEG PS, MANN D, NEWLAND C, BLASÉ M, OPPENHEIM JJ. Deficient DR antigén expression on human cord blood monocytes: reversa with lymphokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1984; **30**: 430-436.
39. TAKEUCHI Y, SAKURAI K, IKE I, YOSHIE H, KAWASAKI K, HARA K. ICAM-1-expressing pocket epithelium, LFA-1-expressing T cells in gingival tissue and gingival crevicular fluid as features characterizing inflammatory cell invasion and exudation in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 1995; **30**: 426-435.
40. NIELSEN HV, CHRISTENSEN JP, ANDERSSON EC, MARKER O, THOMSEN AR. Expression of type 3 complement receptor on activated CD81 T cells facilitates homing to inflammatory sites. *J Immunol* 1994; **153**: 2021-2028.
41. McDONALD B, KUBES P. Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking. *Front Immunol* 2015; **6**: 68

List of tables

Table 1

Frequencies (%) of cells immunolabelled for molecules/cytokines in the population of negative CD14 monocytes (CD14-).

Parameter	Control		LPS		LPS+HA		Value of p*
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Total CD80	6.2	1.8	14.5	3.8	15	5.7	<0.05 ^{1,2} / ns ³
CD80 in CD14+	6.2	1.7	10.2	3.2	10.4	4.4	<0.05 ^{1,2} / ns ³
CD80 in CD14-	15.2	5.9	31.8	10.2	26.2	8.1	<0.05 ^{1,2} / ns ³
Total CD86	62.7	19	35.3	12.7	39.8	15	<0.05 ^{1,2} / ns ³
CD86 in CD14+	72.7	14.1	38.9	10.4	49	10.5	<0.05 ^{1,2,3}
CD86 in CD14-	54.7	21.8	43.9	18.8	41.9	19.1	<0.05 ^{1,2} / ns ³
Total HLA-DR	68.2	14.4	60.8	12.4	59.4	14.6	<0.05 ^{1,2} / ns ³
HLA-DR in CD14+	76	12.8	71.5	10.2	74.8	10.5	ns ^{1,2,3}
HLA-DR in CD14-	59.9	15.9	54.3	16	52.3	16.6	<0.05 ² / ns ^{1,3}
Total CD11b	65.9	4.8	64	9.1	60.3	8.9	ns ^{1,2,3}
CD11b in CD14+	87.6	3.1	81.3	4.1	86.7	3.7	<0.05 ^{1,3} / ns ²
CD11b in CD14-	36.7	15.1	46.7	9.9	50.7	12.5	<0.05 ² / ns ^{1,3}

* Values of *p* obtained by ANOVA test, a criterion of repetition followed by Bonferroni *post hoc* test.

ns - not significant ($p > 0.05$)

SD - Standard Deviation

¹ Medium *versus* LPS

² Medium *versus* LPS+HA

³ LPS *versus* LPS+HA

Table 2
 Mean Intensity of the expression of surface molecules in the total population of monocytes.

Parameter	Control		LPS		LPS+HA		Value of p^*
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
CD80 MIF	554.6	34.5	654.6	61	642.2	59.4	<0.05 ^{1,2} / ns ³
CD86 MIF	163.9	43.8	123.9	35.6	135.1	42.2	<0.05 ^{1,2} / ns ³
HLA-DR MIF	99.5	25	91.4	22	91.1	20.7	ns ^{1,2,3}
CD11b MIF	24.5	1.2	22.8	1.3	24.7	2.1	<0.05 ^{1,3} / ns ²

* Values of p obtained by ANOVA test, a criterion with repetition followed by Bonferroni *post hoc* test.

ns - not significant ($p > 0.05$)

SD - Standard Deviation

¹ Medium *versus* LPS

² Medium *versus* LPS+HA

³ LPS *versus* LPS+HA

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O AH apresenta propriedades biológicas que melhoram parâmetros clínicos periodontais quando utilizado como adjuvante do tratamento da doença periodontal. No entanto, o seu efeito nos mecanismos imunoinflamatórios não está completamente elucidado. O presente trabalho demonstrou que adição de AH a monocitos estimulados com LPS de *P. gingivalis* alterou a expressão das moléculas de superfície CD86 e CD11b, as quais desempenham importante papel no recrutamento leucocitário e na co-estimulação de linfócitos T, respectivamente. Dessa forma, é possível que a ligação do AH a receptores de leucócitos estimulados por produtos de periodontopatógenos nos tecidos periodontais afete a expressão de outras moléculas envolvidas nos processos imunoinflamatórios. O estudo das características fenotípicas e funcionais de linfócitos T é necessário para verificar se as alterações na expressão de moléculas de superfície de monócitos induzidas pelo AH são capazes de afetar a atividade linfocitária. A melhor compreensão sobre os efeitos do AH na atividade de células imunocompetentes presentes no ambiente periodontal pode elucidar seus efeitos diretos nos eventos celulares inflamatórios, além dos efeitos já demonstrados sobre bactérias e mecanismos de reparo tecidual.

REFERENCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMANN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.

ABBAS, A.K. ; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica**. Funções e distúrbios do sistema imunológico. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.

ALTIERI, D.C. et al. A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.21, p. 12119-12122, 1990.

ALTIERI, D.C.; EDINGTON, T.S. The saturable high affinity association of factor X to ADP- stimulated monocytes defines a novel function of the Mac-1 receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.15, p. 7007-7015, 1998.

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, n.3, p. 209-220, Jan. 2006.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, n.6673, p. 245-252, Mar. 1998.

BANSAL, J.; KEDIGE, S.D.; ANAND, S. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. **Indian Journal of Dental Research**, v.21, p. 575-578, 2010.

BISSON-BOUTELLIEZ, C. et al. CD9 and HLA-DR expression by crevicular epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils in periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.28, n.7, p. 650-656, July 2001.

BOGAERDE, L.V. Treatment of infrabony periodontal defects with esterified hyaluronic acid: clinical report of 19 consecutive lesions. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v.29, n.3, p. 315-323, June 2009.

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.

CAMPO, G.M. et al. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. **Biofactors**, v.38, p. 69-76, 2012.

CHAUHAN, A.S. et al. Comparative analysis of hyaluronan gel and xanthan-based chlorhexidine gel, as adjunct to scaling and root planing with scaling and root planing alone in the treatment of chronic periodontitis: a preliminary study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v.4, n.1, p. 54-61, Jan. 2013.

CRUVINEL, W.M. et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p. 434-461, July/Aug. 2010.

DARVEAU, R.P. et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p. 5041-5051, 2004.

DIAMONT, M.S. et al. ICAM-1(CD54): a counter-receptor for Mac-1(CD11b/CD18). **The Journal of Cell Biology**, v.111, n.6, p. 3129-3139, 1990.

DICKER, K.T. et al. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.4, p. 1558-1570, Apr. 2014.

EICK, S. et al. Hyaluronic acid as an adjunct after scaling and root planing: a prospective randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, v.84, p. 941-949, 2013.

FAWZY, E.S.K.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.

FERGUSON, E.L. et al. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments. **International Journal of Pharmaceutics**, v.420, n.1, p. 84-92, Nov. 2011.

FIELDS, P.E. et al. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. **The Journal of Immunology**, v.161, n.10, p. 5228-5275, 1998.

JANEWAY JR, C.A. MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v.20, p. 197-216, 2002.

JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P.W. Hyaluronan in tissue injury and repair. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.23, p. 435-461, 2007.

KAWAI, K. et al. Epigallocatechin gallate attenuates adhesion and migration of CD8+ T cells by binding to CD11b. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.113, n.6, p. 1211-1217, June 2004.

LAURENT, T.C. et al. Hyaluronan in inflammatory joint disease. **Acta Orthopaedica Scandinavica. Supplementum**, v.266, p. 116-120, Oct. 1995.

LINSEY, P.S.; LEDBETTER, J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review of Immunology**, v.11, p. 191-212, 1993.

LINSLEY, P.S. et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v.1, n.9, p. 793-801, 1994.

MANZOTTI, C.N. et al. Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. **European Journal of Immunology**, v.36, n.6, p. 1413-1422, June 2006.

MARLIN, S.D.; SPRINGER, T.A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). **Cell**, v.51, p. 813-819, 1987.

MESA, F.L. et al. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. **Histology and Histopathology**, v.17, p. 747-753, 2002.

MYSAK, J. et al. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. **Journal of Immunology Research**, v.2014, p. 476068, 2014.

NIELSEN, H.V. et al. Expression of type 3 complement receptor on activated CD81 T cells facilitates homing to inflammatory sites. **The Journal of Immunology**, v.153, p. 2021-2028, 1994.

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, n.8, p. 461-465, Sept. 2006

OLSSON, C. et al. Biased dependency on CD80 versus CD86 in the induction of transcription factors regulating the human IL-2 promoter. **International Immunology**, v.10, n.4, p. 499-506, 1998.

PADMA, R. et al. Hyaluronic acid - a simple, unusual polysaccharide: a potential mediator for periodontal regeneration. **Journal of Dentistry**, v.3, n.3, p. 113-119, 2013.

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.

PILLONI, A. et al. Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. **Annali di Stomatologia Accademia Stomatologica di Roma**, v.2, n.3-4, p. 3-9, Mar. 2011.

PIRNAZAR, P. et al. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. **Journal of Periodontology**, v.70, p. 370-374, 1999.

PISTORIUS, A et al. The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. **Quintessence International**, v.36, n.7-8, p. 531-538, July/Aug. 2005.

PRESTI, D.; SCOTT, J.E. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.) radicals is dependent on

hyaluronan molecular mass. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.12, p. 281-288, 1994.

RAZMA, A.G. et al. Expression of Ia-like (DR) antigen on human alveolar macrophages isolated by bronchoalveolar lavage. **The American Review of Respiratory Disease**, v.129, n.3, p. 419-424, 1984.

SADOWITZ, B. et al. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. **Journal of Surgical Research**, v.173, n.2, p. e63-72, Apr. 2012.

SANSOM, D.M.; MANZOTTI, C.N.; ZHENG, Y. What's the difference between CD80 and CD86? **Trends in Immunology**, v.24, p. 313-318, 2003.

SMITH, C.W. et al. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v.83, n.6, p. 2008-2017, June 1989.

SOUZA, P.E.A. et al. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v.75, p. 1886-1894, 2007.

STAUNTON, D.E.; DUSTIN, M.L.; SPRINTER, T.A. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand of LFA-1 homologous to ICAM-1. **Nature**, v.339, p. 61-64, 1989.

STIEHM, E.R. et al. Deficient DR antigén expression on human cord blood monocytes: reversa with lymphokines. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.30, n.3, p. 430-436, 1984.

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

THOMPSON, H.L.; MATSUSHIMA, K. Human polymorphonuclear leucocytes stimulated by tumour necrosis factor-alpha show increased adherence to extracellular matrix proteins which is mediated via the CD11b/18 complex. **Clinical & Experimental Immunology**, v.90, n.2, p. 280-285, Nov. 1992.

TOOLE, B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v.12, n.2, p. 79-87, Apr. 2001.

VAN DER MERWE, P.A. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with low affinity and very fast kinetics. **The Journal of Experimental Medicine**, v.185, n.3, p. 393-403, Feb. 1997.

VEDAMURTHY, M. Soft tissue augmentation--use of hyaluronic acid as dermal filler. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.70, n.6, p. 383-387, Nov./Dec. 2004

WALKER, L.S.; SANSOM, D.M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. **Trends in Immunology**, v.36, n.2, p. 63-70, Feb. 2015.

WANG, S.; CHEN, L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cellular & Molecular Immunology**, v.1, p. 37-42, 2004.

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontitis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v.15, p. e7, Aug. 2013.

ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22097313.0.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 436.196

Data da Relatoria: 21/10/2013

Apresentação do Projeto:

O ácido hialurônico (AH) é um componente da matriz extracelular que tem sido utilizado no tratamento de inflamações articulares e da doença periodontal. Recentemente, foi demonstrado que aplicação de AH em defeitos ósseos acelera a neoformação óssea. Serão coletados 20ml de sangue de quinze doadores voluntários saudáveis através de punção de veia periférica, utilizando-se tubos vacutainer heparinizados. Como critérios de inclusão, os doadores deverão ser adultos e imunocompetentes. Como critérios de exclusão, os indivíduos não devem estar fazendo uso de medicação que interfira na resposta imunoinflamatória, como antiinflamatórios e drogas imunossupressoras, e não apresentar doença autoimune ou inflamatória crônica.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar o efeito do AH nas características funcionais de monócitos e linfócitos humanos in vitro, comparando as frequências de células positivas para os marcadores e a intensidade de expressão desses marcadores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os indivíduos voluntários poderão sentir desconforto durante a punção venosa e pode haver formação de hematoma na região da punção. Para minimizar a formação de hematoma, deverá ser feita compressão com algodão na área, após punção, por cerca de 1 a 3 minutos.

Benefícios: Os resultados desse estudo permitirão melhor compreensão dos mecanismos de ação do ácido hialurônico nas células inflamatórias, o que poderá possibilitar novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias, como a gengivite e periodontite.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Temática interessante, sendo o projeto bem redigido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Recomendações:

Modificar a seguinte informação no TCLE: substituir a frase "A coleta de sangue será feita por pesquisador com experiência nesse procedimento" para "A coleta de sangue será realizada pela Enfermeira Luzia Joana Vilela (COREM-MG 148001), funcionária do Departamento de Odontologia da PUC Minas, no Laboratório de Biologia Oral deste Departamento".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação do projeto, desde que atenda às recomendações desse Parecer.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP

Acatar as recomendações do Parecer.

BELO HORIZONTE, 25 de Outubro de 2013

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)