

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

Edson Costa e Silva

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR
NAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DE MONÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS POR *Porphyromonas gingivalis***

Belo Horizonte

2018

Edson Costa e Silva

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR
NAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DE MONÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS POR *Porphyromonas gingivalis***

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

Linha de Pesquisa: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares

Belo Horizonte

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

S586e Silva, Edson Costa e
Efeito do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular nas características fenotípicas e funcionais de monócitos humanos estimulados por *Porphyromonas gingivalis* / Edson Costa e Silva. Belo Horizonte, 2018.
111f. : il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Coorientador: Rodrigo Villamarim Soares
Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Ácido hialurônico. 2. Monócitos. 3. *Porphyromonas gingivalis*. 4. Citocinas. 5. Doença periodontal - Prevenção. 6. Gengivite. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. II. Soares, Rodrigo Villamarim. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.311.2

Ficha catalográfica elaborada por Fabiana Marques de Souza - CRB 6/2086

Edson Costa e Silva

**EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR
NAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DE MONÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS POR *Porphyromonas gingivalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Profa. Dra. Paula Rocha Moreira – UFMG
- 2- Profa. Dra. Lorenza Carvalhaes Machado de Souza – FEAD
- 3- Profa. Dra. Márcia Almeida Lana – PUC Minas
- 4- Profa. Dra. Joice Dias Corrêa – PUC Minas
- 5- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 27 de abril de 2018

A tese, nesta identificadora, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

*Dedico este trabalho primeiramente a DEUS que está acima de tudo,
e que torna o inalcançável cada vez mais próximo de quem acredita...
Aos meus queridos pais Romildo e Cleonice, que me deram todo suporte.
À minha querida esposa Mariana pelo amor, companheirismo, apoio e compreensão.
À minha segunda mãe, minha madrinha Marília por estar sempre presente.
Ao meu irmão Silvio pela amizade e parceria.
Dedico mais essa conquista a vocês que entenderam minha ausência, mas com muito carinho,
apoiaram e acreditaram que eu seria capaz.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, primeiramente, por tornar tudo isso possível e colocar pessoas certas em meu caminho contribuindo para meu crescimento espiritual, intelectual e profissional.

À Nossa Senhora Aparecida por me socorrer nos momentos mais atribulados.

Aos meus pais Romildo e Cleonice, pilares da minha vida que me apoiaram desde o início da minha existência e não medem esforços para me ver feliz.

À Mariana, minha esposa, pelo amor, apoio, companheirismo e compreensão, por entender minha ausência em diversos momentos e por me mostrar que caminhamos juntos em todas as situações.

À minha madrinha Marília por tudo que faz por mim desde que existo.

Ao meu irmão Silvio e minha cunhada Ana, por estarem sempre dispostos a ajudar.

À minha sogra Tina, meu sogro Chico, meu cunhado Júnior pelo carinho, apoio e pelas palavras que me fizeram a diferença.

Ao meu orientador Paulo Eduardo Alencar de Souza, exemplo de profissional, professor, pesquisador, por nossa amizade e por me ajudar a conquistar mais esse título enriquecendo ainda mais meus conhecimentos na Odontologia.

Ao meu coorientador Rodrigo Villamarim Soares, mais que um mestre, um amigo que tive a honra e o prazer de conhecer.

Ao professor Martinho Campolina Rebello Horta pelo incentivo e exemplo de ética profissional.

À Dra. Lis Ribeiro do Vale Antonelli, por me receber tão bem em seu laboratório, pela valiosa contribuição na realização da pesquisa e ajuda na análise dos dados.

À Dra. Luara Isabela dos Santos por dedicar seu tempo e dividir seu conhecimento em todo o processo laboratorial do nosso trabalho.

À Professora Márcia Almeida Lana, Professor Luiz de Macêdo Farias e à Natália Rocha Guimarães pelo auxílio fundamental no cultivo das bactérias.

Aos colegas do Doutorado Turma II, pelos momentos enriquecedores divididos.

À PUC-Minas por me receber de braços abertos para mais essa conquista.

Ao Instituto René Rachou da FIOCRUZ Minas pela parceria e permitir que realizasse a parte laboratorial em sua Instituição.

À toda equipe de professores do Programa de Doutorado de Odontologia da PUC Minas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à FIP PUC-Minas pelo apoio financeiro e suporte ao estudo.

À Silvania e Angélica pela simpatia, carinho e sempre estarem prontas a ajudar.

Enfim à todos que fizeram parte, mesmo que indiretamente de mais essa realização.

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um importante componente da matriz extracelular que tem sido utilizado, em sua forma sintética, como tratamento em diversas áreas da saúde. Vários estudos mostraram que o AH interfere em processos biológicos como inflamação, angiogênese, diferenciação celular e reparo tecidual. Esses efeitos dependem do peso molecular do AH, pois moléculas de baixo peso estimulam a inflamação e a angiogênese, enquanto as de alto peso estimulam processos de reparo tecidual. Embora estudos mostrem resultados clínicos satisfatórios do uso do AH como adjuvante no tratamento da gengivite e da doença periodontal, seu efeito nas características fenotípicas e funcionais de células imunocompetentes estimuladas por produtos de periodontopatógenos ainda não foi avaliado. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do AH de alto (AHA) e de baixo (AHB) peso molecular na expressão de moléculas de superfície e na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados *in vitro* por *Porphyromonas gingivalis*. Para isso, células mononucleares de sangue periférico de dez indivíduos foram estimuladas com *P. gingivalis* (Pg) e em seguida incubadas com AH de alto ou de baixo peso molecular a 0,2%. Por meio de reações de imunofluorescência e citometria de fluxo foi avaliada a expressão das moléculas CD40, CD80, CD86, HLA-DR, TLR2 e TLR4, bem como das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α por monócitos CD14⁺ e por subpopulações de monócitos identificadas pela expressão de CD16 (clássicos: CD14⁺CD16⁻ e intermediários: CD14⁺CD16⁺). As frequências de células imunomarcadas e a intensidade de expressão das moléculas foram comparadas por meio do teste ANOVA um critério com repetição, com nível de significância de 5%. Nas células não estimuladas com Pg, AHA e AHB aumentaram a expressão de TLR2 em todas as populações de monócitos e reduziram a expressão de TLR4 nas populações CD14⁺ e CD14⁺CD16⁻. As frequências de monócitos intermediários CD80⁺ e HLA-DR⁺ foram maiores nos grupos tratados com AHA do que com AHB. As frequências de monócitos totais IL-1 β ⁺ e de monócitos clássicos IL-1 β ⁺ e TNF- α ⁺ também foram maiores no grupo AHA quando comparado ao AHB. Nas células estimuladas com Pg, AHA e AHB aumentaram a expressão de TLR2 nos monócitos CD14⁺ e nos monócitos clássicos. Apenas AHA aumentou expressão de CD40, HLA-DR e TLR2 na população intermediária. Comparando os tipos de AH nas células estimuladas com Pg, monócitos intermediários incubados com AHA exibiram maior expressão de CD40 e de HLA-DR que aqueles incubados com AHB. A adição de AHA ou AHB não afetou significativamente a expressão das citocinas avaliadas nas células estimuladas com Pg. Esses dados sugerem que subpopulações monocíticas são diferentemente afetadas pelo AH e que, principalmente, o AH de alto peso é capaz de aumentar a atividade de monócitos intermediários estimulados com Pg pela expressão de TLR2, CD40 e HLA-DR. O efeito antiinflamatório do AH observado clinicamente nos tecidos periodontais parece não ser por ação modulatória de células imunocompetentes estimuladas por *P. gingivalis*.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Monócitos. *Porphyromonas gingivalis*. Citocinas. Moléculas co-estimulatórias.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is an important component of the extracellular matrix that has used, in its synthetic form, as a treatment in several health areas. Studies have shown that HA interferes with biological processes such as inflammation, angiogenesis, cell differentiation and tissue repair. These effects depends on the molecular weight of HA because low-molecular-weight molecules stimulate inflammation and angiogenesis, while the high-weight molecules stimulate tissue repair processes. Although studies have shown satisfactory clinical results of the use of HA as adjuvant in the treatment of gingivitis and periodontal disease, its effect on the phenotypic and functional characteristics of immunocompetent cells stimulated by periodontopathogens products has not yet evaluated. The aim of this work was to evaluate the effect of high (HAH) and low (HAL) molecular weight on surface molecule expression and cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* by *Porphyromonas gingivalis*. For this, peripheral blood mononuclear cells from ten donors were stimulated with *P. gingivalis* (*Pg*) and then incubated with high or low molecular weight HA at 0.2%. The expression of the CD40, CD80, CD86, HLA-DR, TLR2 and TLR4 molecules, as well as the IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 cytokines were evaluated by means of immunofluorescence and flow cytometry reactions and TNF- α by CD14⁺ monocytes and subpopulations of monocytes identified by CD16 expression (classical: CD14⁺CD16⁻ and intermediates: CD14⁺CD16⁺). The immunoblotted cell frequencies and the expression intensity of the molecules were compared by means of the ANOVA test with a repeating criterion, with a significance level of 5%. In cells not stimulated with *Pg*, HAH and HAL increased TLR2 expression in all monocyte populations and reduced TLR4 expression in the CD14⁺ and CD14⁺CD16⁻ populations. The frequencies of CD80⁺ and HLA-DR⁺ intermediate monocytes were higher in the HAH-treated than in the HAL-treated groups. The frequencies of total IL-1 β ⁺ monocytes and of classical IL-1 β ⁺ and TNF- α ⁺ monocytes were also higher in the HAH group when compared to HAL. In cells stimulated with *Pg*, HAH and HAL increased TLR2 expression in CD14⁺ monocytes and classical monocytes. Only HAH increased expression of CD40, HLA-DR and TLR2 in the intermediate population. Comparing the types of HA in the *Pg*-stimulated cells, intermediate monocytes incubated with HAH exhibited higher CD40 and HLA-DR expression than those incubated with HAL. The addition of HAH or HAL did not significantly affect the expression of the cytokines evaluated in the cells stimulated with *Pg*. These data suggest that monocytic subpopulations are differentially affected by HA and that, mainly, high-weight HA is able to increase the activity of *Pg*-stimulated intermediate monocytes by the expression of TLR2, CD40 and HLA-DR. The antiinflammatory effect of HA observed clinically in periodontal tissues does not appear to be by the modulatory action of immunocompetent cells stimulated by *P. gingivalis*.

Keywords: Hyaluronic acid. Monocytes. *Porphyromonas gingivalis*. Cytokines. Co-stimulatory molecules.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
AHA	Ácido hialurônico de alto peso molecular
AHB	Ácido hialurônico de baixo peso molecular
APCs	Células apresentadoras de antígeno profissionais
BMP-2	Proteína óssea morfogenética-2
BSA	Albumina Bovina Sérica
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
DCs	Células dendríticas
HARE	<i>hyaluronan receptor for endocytosis</i>
HAS	Ácido hialurônico sintase
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
Inos	enzima óxido nítrico sintase
LB	Linfócitos B
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Linfócitos C
LYVE-1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluran receptor-1</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
ON	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRPs	Receptores de Padrões de Reconhecimento
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Pg</i> -LPS	LPS derivado de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan-mediated motility expressed protein</i>
SOCS	<i>supressor of cytokine signaling</i>
TCR	Receptores de células T
TGF- β	Fator de crescimento transformante-beta
TLRs	<i>toll like receptors</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidades formadoras de colônia
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLA-4	Integrina alfa-4 beta-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Ácido Hialurônico.....	21
2.2 Aplicação clínica do ácido hialurônico	23
2.3 Fatores moleculares e celulares no processo inflamatório periodontal.....	26
2.4 Participação do ácido hialurônico nos processos imunoinflamatórios	32
3 HIPÓTESES	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo geral.....	37
4.2 Objetivos específicos.....	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 Amostras de sangue.....	39
5.2 Ácido hialurônico.....	39
5.3 Preparo das bactérias.....	39
5.4 Determinação da citotoxicidade de AHB e AHA.....	40
5.5 Estimulação de células mononucleares de sangue periférico com AH e P. gingivalis.....	40
5.6 Reações de imunofluorescência e citometria de fluxo	42
5.7 Análise estatística.....	43
6 ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	45
7 ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	75
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas	109

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário e reparação tecidual pós-inflamação, tornando a migração e a diferenciação celular mais fáceis por meio de sinalização celular e interação com fatores de crescimento presentes no interstício (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010; TOOLE, 2001). Suas moléculas podem ser de baixo peso molecular ou de alto peso molecular apresentando efeitos antagônicos. As moléculas de alto peso molecular, têm função de preenchimento tecidual e exibem ação imunossupressora (DICKER et al., 2014), além de inibir a proliferação e migração de células endoteliais, dificultando assim a angiogênese. Uma das características do AH de baixo peso molecular é o seu marcante efeito angiogênico (DEED et al., 1997).

Várias células possuem receptores específicos para o AH, sendo o CD44 o mais importante (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Entretanto, o AH também é capaz de interagir com os TLRs (toll like receptors) (JIANG et al., 2007), mascarando esse receptor, o que poderia dificultar a ligação de lipopolissacarídeos (LPS), modulando assim a resposta inflamatória (CAMPO et al., 2012).

A utilização do AH no tratamento de processos inflamatórios é bem estabelecida em áreas médicas tais como Ortopedia, Dermatologia e Oftalmologia (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Na Odontologia, o AH mostrou efeito anti-inflamatório, antibacteriano e de inibição do edema no tratamento da gengivite (JENTSCH et al., 2003). O mecanismo de ação do AH sobre as bactérias ainda é incerto. Provavelmente o hialurano inativa a hialuronidase, produzida pelas bactérias presentes na doença periodontal, auxiliando na prevenção do aumento dessas bactérias e de uma maior destruição dos tecidos periodontais (AL-BAYATY et al., 2011). Foi proposto também que o efeito anti-inflamatório poderia ser devido à ação do AH como um eliminador de prostaglandinas, metaloproteinases e outras moléculas bio-ativas presentes no interstício (LAURENT; LAURENT; FRASER, 1995). A utilização clínica do AH na forma de gel como adjuvante no tratamento da periodontite reduziu a proliferação celular de fibroblastos e linfócitos, diminuiu o processo inflamatório e propiciou melhora clínica nos pacientes (MESA et al., 2002). Outro estudo mostrou diminuição de sangramento, redução de profundidade à sondagem, redução do índice de placa e ganho de inserção em pacientes com doença periodontal tratados com gel de AH de uso tópico (PILLONI et al., 2011).

Monócitos e macrófagos são importantes células da resposta imune contra microrganismos pela atividade fagocítica e microbicida, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (LE-BARILLEC et al., 2005; RAUPACH; KAUFMANN, 2001). Os monócitos possuem características peculiares quanto a produção de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de ativação celular frente à invasão por agentes patogênicos (GEISSMANN, JUNG et al., 2003; SERBINA, JIA et al., 2008). Subpopulações de monócitos circulantes que exibem características funcionais distintas foram classificadas com base na expressão de marcadores de superfície em: monócitos clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) (ZEIGLER-HEITBROCK, ACUNTA et al., 2010; ZAWADA et al., 2011).

A expressão de moléculas co-estimulatórias e a secreção de citocinas por células apresentadoras de antígeno, como as da linhagem monocítica/macrofágica, são eventos importantes nos processos de combate aos microrganismos e de destruição tecidual (GEMMELL et al., 2002). Essas moléculas apresentam papel reconhecido na patogênese da doença periodontal (GARLET, 2010; GEMMELL et al., 2002; ORIMA et al., 2001). A resposta imuno-inflamatória na doença periodontal é responsável pelo maior dano causado aos tecidos periodontais, gerando as alterações patológicas que caracterizam as manifestações clínicas da doença (GRAVES, 2008). As citocinas não só atuam como iniciadoras e reguladoras da imunidade inata e adaptativa na doença periodontal, mas também ativam mecanismos que causam danos teciduais, gerando perda de função e doença clínica (GRAVES, 2008).

O AH vem sendo estudado devido ao sucesso em sua aplicação clínica no tratamento da gengivite, periodontite e alterações periimplantares, com resultados satisfatórios. Os estudos apontam que o AH apresenta potencial anti-inflamatório e estimulador do reparo tecidual em sítios cirúrgicos. Leucócitos e outros tipos celulares são capazes de responder à ligação do AH a moléculas de superfície celular o que pode modular a função dessas células. Embora estudos clínicos tenham sido realizados, são escassos os trabalhos avaliando os efeitos do AH na modulação de células imunocompetentes estimuladas por microrganismos, o que poderia explicar o mecanismo de ação dessa molécula no tratamento das doenças inflamatórias, como as doenças periodontais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido Hialurônico

Descoberto em 1934 por dois cientistas Karl Meyer e John Palmer, ambos da Universidade de Columbia, Nova York, o ácido hialurônico (AH) foi isolado a partir do humor vítreo dos olhos de bovinos (VEDAMURTHY, 2004). O AH é um polissacarídeo linear pertencente a um grupo de substâncias conhecidas como glicosaminoglicanas presentes na matriz extracelular, que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário e reparação tecidual pós-inflamação, tornando a migração e a diferenciação celular mais fáceis, por meio de sinalização celular e interação com fatores de crescimento presentes no interstício (HORTON et al., 1998; MCKEE et al., 1996). Está presente no fluido sinovial, mesênquima embrionário, no humor vítreo, pele, dentre outros órgãos e tecidos do corpo humano (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010; TOOLE, 2001). Atua na regulação da pressão osmótica e lubrificação tecidual, ajudando a manter a homeostase e integridade estrutural dos tecidos (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010; LAURENT; LAURENT; FRASER, 1995). A presença do AH em meio ao coágulo sanguíneo favorece a invasão e colonização deste por células mesenquimais e epiteliais basais, envolvidas no processo de reparo do tecido danificado (TOOLE, 2001). A concentração do AH livre nos tecidos é relativamente baixa. No entanto, os níveis de AH são drasticamente elevados quando rápida regeneração e proliferação celulares são requeridas, como na resposta à injúria tecidual e também durante a embriogênese (ASLAN; SIMSEK; DAYI, 2006). Além de funcionar como arcabouço estrutural na matriz extracelular o AH é uma molécula dinâmica que influencia o comportamento celular (revisado por JIANG; LIANG; NOBLE, 2007).

As moléculas do AH podem ser de baixo peso molecular (cerca de 20 kDa) ou de alto peso molecular (3000-4000 kDa) (SADOWITZ et al., 2012). Oligossacarídeos derivados de AH de alto peso molecular têm funções distintas das grandes moléculas de AH (WEST et al., 1985). As moléculas de alto peso molecular, têm função de preenchimento tecidual, exibem ação imunossupressora, inibem a proliferação e migração de células endoteliais, dificultando assim a angiogênese (DICKER et al., 2014). Além disso, alguns autores sugerem que promova a quiescência celular (SLEVIN et al., 2007). Durante o processo inflamatório, moléculas de AH de alto peso molecular (mais de 10^6 Da) constituintes da matriz extracelular são degradadas pela enzima hialuronidase, gerando fragmentos de baixo peso, os quais promovem a neoformação vascular (BRIGUGLIO et al., 2013; DEED et al., 1997). Termeer

et al. (2000) demonstraram que AH de baixo peso induz diferenciação de monócitos humanos em células dendríticas com fenótipo maduro. Fieber et al. (2004) mostraram que fragmentos de AH de baixo peso induzem expressão de MMP-9 e MMP-13 em células de carcinoma de pulmão. Diversos estudos mostraram que formas de baixo peso molecular do AH foram capazes de induzir respostas inflamatórias em macrófagos inflamatórios, mas não em macrófagos residentes (revisado por JIANG; LIANG; NOBLE, 2007). Essas formas de baixo peso, mas não longas moléculas de AH, são capazes de estimular a produção de mediadores inflamatórios, como as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 em linhagem de macrófagos alveolares murinos (BECK-SCHIMMER et al., 1998), CCL2 (*chemokine C-C motif ligand 2*) também conhecida como MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) em células de epitélio de túbulo renal de camundongos (OERTLI et al., 1998) e IL-1 β , TNF- α e IL-12 em células dendríticas (TERMMER et al., 2000). Fragmentos de baixo peso molecular de AH induzem expressão de diversos mediadores inflamatórios em macrófagos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteases e óxido nítrico (revisado por JIANG; LIANG; NOBLE, 2007). Por outro lado, moléculas de AH de alto peso molecular são capazes de inibir a expressão de TNF- α , IL-8 e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em sinoviócitos de modelo experimental de osteoartrite murino (WANG et al., 2006).

O AH é capaz de se ligar covalentemente à diferentes receptores de superfície celular, como CD44, expresso por fibroblastos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility expressed protein*), LYVE-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluran receptor-1*) (revisado por JIANG; LIANG; NOBLE, 2007) e HARE (*hyaluronan receptor for endocytosis*) (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Ligação do AH ao CD44 ativa diferentes vias de sinalização intracelular e desempenha importante papel na inflamação, ativação e recrutamento de linfócitos e crescimento tumoral (LESLEY et al., 1993).

A estrutura de dissacarídeos repetidos do AH apresenta características de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e estudos mostraram que fragmentos de AH induzem expressão de genes de quimiocinas de modo dependente de TLR2, TLR4 e da molécula MyD88, em macrófagos peritoneais de camundongos (revisado por JIANG; LIANG; NOBLE, 2007). Foi demonstrado também que fragmentos de AH de baixo peso molecular induzem maturação de células dendríticas de modo independente de CD44 ou RHAMM, mas dependente de TLR4 (TERMMER et al., 2000). Por outro lado, resultados de

Campo et al. (2012) sugeriram que a ligação do AH aos TLRs possa dificultar a ligação de LPS a estes receptores, modulando assim a resposta inflamatória.

A característica viscoelástica do AH serve como uma barreira à difusão de macromoléculas (PISTORIUS et al., 2005), podendo ainda dificultar a penetração de vírus e bactérias (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Contudo, estes efeitos dependem do tamanho molecular, pois a variação do número de unidades funcionais moleculares do AH determina distintos comportamentos biológicos, por meio da ativação de diferentes vias de transdução de sinais celulares (FERGUSON et al., 2011). Durante o processo inflamatório, o AH apresenta ação moduladora, o que pode alterar a biodisponibilidade de mediadores inflamatórios e enzimas secretadas na matriz extracelular (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Além disso, tem efeito protetor contra radicais livres, que danificam as células e podem perpetuar o processo inflamatório (PRESTI; SCOTT, 1994).

Foi demonstrado que a administração sistêmica, local ou tópica de AH inibe a maturação e a migração de células dendríticas imaturas da epiderme (células de Langerhans) *in vivo* (MUMMERT et al., 2000).

2.2 Aplicação clínica do ácido hialurônico

A utilização do AH no tratamento de processos inflamatórios é bem estabelecida em áreas médicas tais como Ortopedia, Dermatologia e Oftalmologia (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). Na Odontologia, o AH mostrou efeito anti-inflamatório, antibacteriano e de inibição do edema no tratamento da gengivite (JENTSCH et al., 2003). Provavelmente o efeito anti-inflamatório pode ser devido à ação do AH como um eliminador de prostaglandinas, metaloproteinases e outras moléculas bio-ativas presentes no interstício (LAURENT; LAURENT; FRASER, 1995).

Vários fármacos foram relatados na literatura como medicamentos de aplicação tópica. Na maioria das vezes estes preparos são limitados à bochechos, que não garantem um contato longo entre o componente ativo e o local da inflamação. O preparo viscoso, em forma de géis ou pastas são melhores na capacidade de se aderir ao tecido gengival, garantindo que o componente ativo irá realizar seu efeito *in situ* por um período de tempo maior (SAPNA, 2005).

O AH pode ser utilizado na periodontia como gel para aplicação tópica, agindo como antimicrobiano adjuvante na raspagem e alisamento radicular; na regeneração óssea em defeitos ósseos periodontais; na regeneração óssea guiada; para o tratamento não cirúrgico de

bolsas peri-implantares; ou como um biomaterial em forma de arcabouço em pesquisas de engenharia de tecidos (BANSAL; KEDIGE; ANAND, 2010). A aplicação clínica na forma de membranas e géis de AH durante a cirurgia, 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).

O AH pode atuar como arcabouço para outras moléculas, como a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), e induzir a reconstrução óssea em extensos defeitos alveolares, como demonstrado em estudo em cães (HUNT et al., 2001). Recentemente, Mendes et al. (2008) verificaram que a aplicação de gel de AH acelerou o processo de cura em alvéolos de dentes de ratos, estimulando a expressão de proteínas osteogênicas como BMP-2 e osteopontina pelas células locais, durante o processo de neoformação óssea. Esses resultados sugerem potencial osteoindutor do AH. Embora apresente características que o tornem um importante material para uso odontológico, ainda são escassos os estudos sobre seu efeito na estimulação da neoformação óssea. Estudo recente mostrou que a aplicação de gel de AH em defeitos ósseos criados em calota craniana de ratos não foi capaz de estimular significativamente a neoformação óssea, embora tenha induzido maior infiltração celular em membrana de colágeno utilizada como barreira (SILVA et al., 2016).

Mesa et al. (2002) avaliaram o efeito do gel de AH de alto peso molecular, clínica e histologicamente, no tratamento da periodontite. Foi realizado um estudo de boca dividida, onde o gel foi aplicado de forma aleatória em um quadrante e no lado oposto foi utilizado um placebo. Estudo histopatológico e imunoistoquímico para detecção do marcador de proliferação celular Ki-67 realizado em fragmentos de biópsia gengival de 28 pacientes com doença periodontal mostrou que o gel de AH reduziu a proliferação celular de queratinócitos, fibroblastos e linfócitos, aumentou o número de sítios sem infiltrado inflamatório e inibiu a progressão do aumento da profundidade de sondagem após 1 mês, com melhora clínica nos pacientes.

Vanden Bogaerde (2009) avaliou a eficácia clínica do AH para tratamento de defeitos periodontais. 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) investigaram a eficácia de um gel à 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 forma de higienização e avaliados após 7, 14 e 21 dias.

No grupo tratado com o AH, todos os parâmetros clínicos periodontais avaliados tiveram melhor resultado, sugerindo potencial do AH em reduzir a inflamação gengival.

Fawzy El-Sayed et al. (2012) em seu estudo de boca dividida, avaliaram clinicamente o efeito da aplicação local do gel de AH juntamente com a cirurgia periodontal em quatorze pacientes com periodontite crônica. Após terapia periodontal não cirúrgica inicial, realizou-se cirurgia utilizando a técnica de Widman modificada, associada à aplicação local do gel de AH a 0,8%. Após 3 e 6 meses foram avaliados os parâmetros: nível de inserção clínica, profundidade da bolsa, recessão gengival, índice de sangramento e índice de placa. O grupo teste apresentou significativa redução da recessão gengival e maior ganho de nível de inserção clínica, indicando que o uso tópico de gel de AH como adjuvante no tratamento cirúrgico periodontal favorece os resultados clínicos.

Briguglio et al. (2013) avaliaram o efeito da utilização de AH no tratamento de defeitos ósseos de duas paredes causados pela doença periodontal. Foram avaliados, durante 24 meses, 40 pacientes, nos quais os defeitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: sítios tratados com AH (teste) e sítios tratados com cirurgia de retalho (controle). Após avaliações clínicas e radiográficas foi possível observar que o tratamento com o AH ofereceu benefícios estatisticamente significativos quanto à profundidade de sondagem, diminuindo a bolsa periodontal e melhorando o nível clínico de inserção.

Eick et al. (2013) fizeram aplicação do gel de AH em pacientes com periodontite e avaliaram parâmetros clínicos e colonização bacteriana subgengival, durante o tratamento periodontal. Os resultados clínicos foram melhores no grupo tratado com AH e a contagem de bactérias após o período de 6 meses foi significativamente reduzida neste grupo em relação ao controle, que exibiu aumento do número de *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*. Esses achados sugerem que a aplicação do gel de AH no tratamento periodontal parece ter efeitos positivos em parâmetros clínicos, além de dificultar a recolonização por periodontopatógenos.

Um estudo clínico avaliando a eficácia bactericida/bacteriostática do AH a 0,025% em comparação à clorexidina em enxaguantes bucais mostrou ausência de efeito do AH sobre o crescimento de *P. gingivalis* (RODRIGUES et al., 2010). Entretanto, Pirnazar et al. (1999) demonstraram o AH em concentração maior (0,1%) foi capaz de afetar o crescimento de *P. gingivalis*, sugerindo que o efeito antimicrobiano do AH seja dose-dependente.

2.3 Fatores moleculares e celulares no processo inflamatório periodontal

A doença periodontal é um processo inflamatório causado pela infecção bacteriana aos tecidos de suporte do dente. As bactérias Gram-negativas anaeróbias estão diretamente envolvidas no início do processo, quando, juntamente com outras espécies presentes no biofilme subgingival, provocam uma reação imunoinflamatória, levando à formação de bolsas periodontais com potencial destruição dos tecidos de suporte (PAGE; EKE, 2007).

As células da resposta imune inata possuem receptores de padrões de reconhecimento (PRRs), capazes de identificar padrões moleculares gerais encontrados nos patógenos (padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs). Entre as bactérias periodontopatogênicas, a *P. gingivalis*, uma bactéria Gram-negativa altamente patogênica, encontra-se intimamente associada à periodontite (MYSAK et al., 2014). O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana das bactérias Gram-negativas e um exemplo clássico de PAMP. Células do sistema imune inato utilizam PRRs específicos, os TLRs (*Toll-like receptors*), para reconhecerem fatores de virulência, como o LPS, e iniciar a resposta imune (MIYAKE, 2004). O LPS derivado de *P. gingivalis* (*Pg-LPS*) apresenta-se, portanto, como importante fator de virulência na doença periodontal (MYSAK et al., 2014). O *Pg-LPS* parece ser capaz de ativar as células do sistema imune via TLR2 e TLR4, estimulando a produção de diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas, e induzindo a expressão de moléculas de superfície (DARVEAU et al., 2004).

O sistema TLR detecta *P. gingivalis* principalmente através de TLR2 tanto *in vitro* como *in vivo*, enquanto TLR4 não desempenha um papel tão importante, devido ao fato do patógeno expressar moléculas de LPS atípicas (HAJISHENGALLIS et al., 2006). Embora *P. gingivalis* não antagonize as funções de TLR2, ela desenvolve estratégias para explorar a sinalização de TLR2 em sua própria vantagem. Após a ativação por *P. gingivalis*, TLR2 induz duas sinalizações distintas (HAJISHENGALLIS et al., 2009). Uma das vias é dependente de MyD88 e leva à indução principalmente de respostas pró-inflamatórias e antimicrobianas dependentes do fator nuclear κ B. A outra é uma via pró-adesiva que leva à indução da expressão de CR3 (HAROKOPAKIS; HAJISHENGALLIS, 2005).

Macrófagos e células dendríticas (DCs), ambos derivados dos monócitos, são células imunoinflamatórias essenciais. As DCs imaturas estão estrategicamente localizadas em tecidos que representam rotas de entrada de patógenos (pele e mucosa), monitorando continuamente o ambiente através da internalização de partículas e produtos solúveis (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Ao reconhecer os produtos microbianos, macrófagos

e DCs produzem e secretam mediadores inflamatórios responsáveis por fenômenos vasculares e celulares associados à proteção do hospedeiro (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; KOPF; BACHMANN; MARSLAND, 2010; WELLS; RAVASI; HUME, 2005). Além disso, têm capacidade fagocitária, microbicida e apresentam afinidade de cooperação com os LB e LT (ELHELU, 1983). Os macrófagos e DCs são também células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs) que conectam o sistema imune inato ao adaptativo ao tornar o antígeno “visível” para o linfócito T (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002).

Uma característica das APCs é a expressão de moléculas co-estimulatórias e de uma molécula de superfície do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Um dos isotipos humanos do MHC II é o HLA-DR. A sensibilização dos LT auxiliares requer a interação entre o seu receptor (TCR) e o complexo antígeno-MHC nas APCs (ALLEY et al., 1993). O aumento da expressão da HLA-DR é também um indicativo de ativação de APCs (RAZMA et al., 1984). O HLA-DR é frequentemente expresso por células epiteliais em tecidos gengivais com doença periodontal, mas não por células nos tecidos gengivais saudáveis (BISSON-BOUTELLIEZ et al., 2001).

Dentre as moléculas co-estimulatórias das APCs, CD80 e CD86 possuem funções semelhantes de se ligarem às moléculas CD28 ou CTLA-4 na superfície de linfócitos T, gerando sinais de ativação ou de inibição da ativação linfocitária, respectivamente (LINSLEY et al., 1994). De modo geral, CD86 apresenta expressão mais abundante que CD80 na célula em repouso, sendo rapidamente aumentada após ativação celular. CD80, pouco encontrado em APCs em repouso, tem sua expressão induzida de forma mais lenta que o CD86 após a ativação celular (INABA et al., 1995; LENSCHOW et al., 1993). Além das diferenças relacionadas à cinética de ligação de CD80 e CD86 aos seus receptores, um número relevante de estudos tem questionado a equivalência dos efeitos coestimuladores gerados por estas duas moléculas. Os resultados contrastam frente ao papel funcional desempenhado por CD80 e CD86 na ativação dos LT, sugerindo diferenças de natureza qualitativa e quantitativa entre as duas moléculas (BOYLAN et al., 1999; FIELDS et al., 1998; LANG et al., 2002). CD80 é provavelmente o ligante mais potente para CD28 em termos de capacidade de ativação celular (FIELDS et al., 1998; OLSSON et al., 1998). Interessante é o fato de que ambos, CD80 e CD86, apresentam maior afinidade de ligação pelo CTLA-4 que pelo CD28 (LINSLEY et al., 1994; VAN DER MERWE et al., 1997).

A interação entre a célula T efetora e as células da resposta imune tanto inata (macrófagos) como adaptativa (linfócitos B) depende do sinal co-estimulatório CD40/CD40L. O CD40L é uma proteína transmembrana da família do fator de necrose tumoral, que está

presente nos linfócitos T ativados e interage com outra proteína de membrana, a CD40 (DAVIDSON et al., 2012; HOLLENBAUGH et al., 1992). Esta interação é crucial para a ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos, importante para a proteção contra agentes intracelulares. A interação CD40-CD40L também amplifica a apresentação de antígenos e aumenta ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T (GREWAL; XU; FLAVELL, 1995).

A existência de diferentes populações de monócitos no sangue humano já está bem estabelecida. Além dos monócitos clássicos, que são fortemente positivos para a molécula de superfície CD14 (CD14⁺⁺), foi descoberta uma população de monócitos que co-expressa CD16 e baixos níveis de CD14 (CD14⁺CD16⁺) (ZIEGLER-HEITBROK; PASSLICK; FLIEGER, 1988), com características fenotípicas e funcionais específicas (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-HEITBROK, 1989). Estas células têm alguns padrões característicos de moléculas de superfície celular quando comparadas aos monócitos clássicos, indicando serem mais maduros que os monócitos CD14⁺⁺ (KWAKKENBOS et al., 2002). O padrão de marcadores de superfície de monócitos se assemelha em muitos aspectos ao padrão observado em macrófagos nos tecidos e estudos de maturação *in vitro* mostraram que essas células podem ser desenvolvidas a partir de monócitos CD14⁺⁺ (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-HEITBROK, 1989). Adicionalmente, monócitos CD14⁺CD16⁺ apresentam perfil mais pró-inflamatório, alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e capacidade de apresentação de antígenos (ZIEGLER-HEITBROK, 2007). A imunomarcagem para CD14 e CD16 pode definir subconjuntos de populações de monócitos humanos, sendo as populações mais abundantes: a clássica CD14⁺⁺CD16⁻ e a intermediária CD14⁺CD16⁺.

Além da sinalização por contato célula-célula, outra importante forma de comunicação celular nas repostas imunoinflamatórias ocorre por meio de citocinas. As citocinas são polipeptídeos secretados em resposta à agentes agressores, que participam da comunicação celular no sítio inflamatório e estão envolvidas na multiplicação, ativação, inibição, recrutamento e morte celular (CANNON, 2000; DINARELLO, 2000). A ativação dos macrófagos presentes nos tecidos por meio do reconhecimento dos produtos microbianos, leva à secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios que são responsáveis por fenômenos vasculares e celulares (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; KOPF; BACHMANN; MARSLAND, 2010; WELLS; RAVASI; HUME, 2005). Nos locais em que há infecção bacteriana, produtos como os lipopolissacarídeos (LPS) ativam macrófagos estimulando a capacidade fagocitária e microbicida, por meio da geração de intermediários reativos derivados do oxigênio (MYSAK et al., 2014).

As citocinas 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 de leucócitos 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 consequente 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). TNF- α e IL-1 também apresentam capacidade de inibir a síntese de colágeno (HARRISON et al., 1998). TNF- α atua no processo de migração celular por induzir a regulação de moléculas de adesão e a estimulação da produção de quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas envolvidas na migração de células para os locais de inflamação (DINARELLO, 2000; KINDLE et al., 2006; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). 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 (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 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 considerada patogênica para várias doenças, incluindo doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide (HUEBER et al., 2010), psoríase (GLOWACKA et al., 2010) e doenças bucais como a 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. A IL-10 interfere diretamente na produção de IFN- γ por linfócitos T, desempenhando um importante papel 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, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (COMMINS; STEINKE; BORISH, 2008; COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). A IL-10 também inibe a expressão das 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 a IL-10 também participa da estimulação da resposta imune, por meio da ativação da proliferação de linfócitos B e estimulação da secreção de imunoglobulinas (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 microrganismos e a destruição tecidual (CANNON, 2000).

A resposta imune inflamatória na doença periodontal é responsável pelo maior dano causado aos tecidos periodontais, gerando as alterações patológicas que caracterizam as manifestações clínicas da doença (ASSUMA et al., 1998). 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 danos teciduais, causando perda de função e doença clínica (ASSUMA, et al., 1998; WAHL et al., 1993). Na resposta inflamatória periodontal, além dos leucócitos, células teciduais como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também são fontes de citocinas (CARRICHES; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ; RODRÍGUEZ, 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, as 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 níveis aumentados em biópsias de tecido periodontal e no fluido do sulco gengival de pacientes com periodontite (YUCEL-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) e estimulando o

recrutamento de neutrófilos pela indução da produção de quimiocinas (PRESHAW; TAYLOR, 2011). 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 do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL), moléculas envolvidas na osteoclastogênese e reabsorção óssea (GARLET et al., 2006; GRAVES, 2008; GRAVES; COCHRAN, 2003). Em modelos animais de doença periodontal, foi demonstrado o papel central do TNF- α na resposta inflamatória, promovendo reabsorção de osso alveolar e perda de inserção de tecido conjuntivo (GRAVES, 2008; GRAVES; COCHRAN, 2003).

Nos tecidos periodontais, a citocina IL-6 é produzida por fibroblastos, linfócitos, monócitos e células epiteliais em resposta aos LPS bacterianos, IL-1 e TNF- α (MADIANOS; BOBETSIS; KINANE, 2005). A 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).

Os níveis de 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 (GARLET et al., 2006; LAPPIN et al., 2001). A IL-10 pode atuar de várias maneiras para restringir a gravidade da doença periodontal. 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).

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., 2010). Já em estudo animal envolvendo camundongos, após a infecção por *P. gingivalis*, os autores observaram que a IL-12 está envolvida com a perda de osso alveolar (SASAKI et al., 2008).

O ácido hialurônico vem sendo estudado devido ao sucesso em sua aplicação clínica no tratamento da gengivite e doença periodontal com melhoras significativas dos parâmetros periodontais. Os estudos apontam que o AH é capaz de se ligar a moléculas de superfície celular, estimular a liberação de citocinas e regular as respostas imunoinflamatórias, o que poderia modular a função dessas células.

2.4 Participação do ácido hialurônico nos processos imunoinflamatórios

O AH é naturalmente produzido principalmente pelos fibroblastos, que expressam 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 pelo fator de crescimento transformante-beta (TGF- β). Além disso, o AH modula a diferenciação de miofibroblastos dependentes de TGF- β (MASCARENHAS et al., 2004).

O extravasamento de leucócitos em resposta às exigências fisiológicas ou patológicas, por meio de interações de ligações complementares entre leucócitos e células endoteliais, ocorre através de um processo de várias etapas. A ligação do receptor CD44 expresso na superfície de linfócitos T ativados com moléculas de AH endoteliais promove uma interação adesiva primária e, sob tensão de cisalhamento, há 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).

Pequenos fragmentos de AH de tetra e hexassacáridos aumentam a produção das citocinas IL-1, TNF- α e IL-12 por DCs, bem como sua capacidade de apresentação antigênica. Estes pequenos fragmentos de AH induzem a maturação de DCs independentemente do CD44 ou do receptor de motilidade de AH (RHAMM), de maneira dependente dos receptores celulares tipo Toll-4 (TLR4) (JIANG; LIANG; NOBLE, 2011).

Um estudo realizado por Christie et al. (2007) demonstrou que a síntese inadequada de AH está correlacionada com uma redução na produção de IL-2 e IFN- γ , bem como a expressão do receptor de IL-2 (CD25) na superfície de linfócitos T, sugerindo papel do AH na proliferação de linfócitos T ativados.

A produção de citocinas nos vasos inflamados pode aumentar a expressão de AH na superfície de células endoteliais, criando assim locais receptivos à interação entre CD44 e AH e, em seguida 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* (ESTESS 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 induzidas por AH é mediada pelo receptor CD44 e é acompanhada por uma ativação precoce de genes de resposta angiogênica (MOHAMADZADEH et al., 2009).

No 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). Em um estudo recente, foi observado que a adição de 300 ng/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). Em outro estudo também foi observado diferenças de atividades biológicas entre AH de alto e baixo peso moleculares, o AH de baixo peso molecular foi capaz de estimular a expressão de NF- κ B, TLR4, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 por condrócitos de ratos, enquanto AH de alto peso molecular apresentou atividade inibitória dessa estimulação (CAMPO et al., 2012).

Em um estudo envolvendo a incubação de AH de baixo e de alto peso moleculares com sangue de cordão umbilical *in vitro*, verificou-se o aumento significativo da expressão de MMP9, IL-1, IL-8 e TNF- α por monócitos, embora apenas AH de alto peso molecular tenha

sido capaz de reduzir a expressão de TLR4 nesses monócitos (OSTERHOLT et al., 2012). Após a 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 (OSTERHOLT et al., 2012).

3 HIPÓTESES

As hipóteses deste estudo foram:

- a) AH é capaz de alterar a expressão de moléculas de superfície envolvidas na sinalização celular e de citocinas em monócitos humanos;
- b) AH de diferentes pesos moleculares afetam de modo diferente a expressão dessas moléculas em monócitos humanos;
- c) AH afeta a expressão de moléculas de superfície envolvidas na sinalização celular e de citocinas em monócitos humanos estimulados com *Porphyromonas gingivalis*;
- d) AH de diferentes pesos moleculares afetam de modo diferente a expressão dessas moléculas em monócitos humanos estimulados com *Porphyromonas gingivalis*;
- e) Subpopulações funcionais de monócitos circulantes são afetadas diferentemente por AH quanto à expressão de moléculas de superfície envolvidas na sinalização celular e de citocinas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido hialurônico de baixo e de altos pesos moleculares nas características fenotípicas e funcionais de monócitos humanos estimulados com *Porphyromonas gingivalis*.

4.2 Objetivos específicos

- a) determinar e comparar as frequências de monócitos expressando as moléculas de superfície HLA-DR, CD16, CD40, CD80, CD86, TLR2 e TLR4 e as citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-alfa após incubação com AH de baixo ou de alto peso molecular;
- b) determinar e comparar as frequências de monócitos estimulados com *P. gingivalis*, expressando as moléculas de superfície HLA-DR, CD16, CD40, CD80, CD86, TLR2 e TLR4 e as citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-alfa após incubação com AH de baixo ou de alto peso molecular;
- c) comparar as frequências de monócitos expressando as moléculas de superfície e as citocinas, em diferentes subpopulações celulares identificadas pelos marcadores CD14 e CD16, após incubação com AH de baixo ou de alto peso molecular;
- d) comparar as frequências de monócitos estimulados com *P. gingivalis*, expressando as moléculas de superfície e as citocinas, em diferentes subpopulações celulares identificadas pelos marcadores CD14 e CD16, após incubação com AH de baixo ou de alto peso molecular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras de sangue

Foram incluídos no presente estudo, dez indivíduos saudáveis, com idade entre 30 e 60 anos, que não possuíam nenhum tipo de doença sistêmica relatada, que não estivessem imunodeprimidos e não faziam uso de medicamentos capazes de interferir na resposta imunoinflamatória ou antimicrobianos de uso tópico, como enxaguantes bucais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas (CAAE: 54227916.0.0000.5137) e conduzido de acordo com normas vigentes (ANEXO A).

Foram coletados 20 mL de sangue de cada indivíduo em tubos heparinizados (Becton Dickinson Vacutainer®, USA) e estes aplicados sobre 20 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Após centrifugação a 200g, por 40 minutos, a 20°C, as CMSP foram recolhidas, lavadas com RPMI. Após contagem de células com Azul de Tripán (0,4%) em aparelho Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen), as CMSP foram ressuspensas em meio completo.

5.2 Ácido hialurônico

Neste estudo foram utilizados ácido hialurônico de baixo peso molecular (AHB) (33 kDa) (GLR001, lote #1467153, R&D Systems) e ácido hialurônico de alto peso molecular (AHA) ($1,46 \times 10^6$ Da) (GLR002, lote #1490155, R&D Systems), ambos com nível de endotoxina $<0,01$ EU/mL. Foram preparadas soluções de AH diluído em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Sigma Aldrich), acrescido de 2 mM de L-glutamina e 5% de soro humano normal (RPMI completo), imediatamente antes do uso.

5.3 Preparo das bactérias

Amostra de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 25611) foi cultivada em *Brain Heart Infusion Agar*, suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de hemina suína e 0,1% de menadiona, pH 7,2, enriquecido com 5% de sangue de carneiro (BHIA-S/E). Os microrganismos foram incubados em câmara anaeróbica com atmosfera de 85% de N₂, 5% CO₂ e 10% H₂ a 37°C, por 72 horas. Para quantificação da cultura bacteriana, foram realizadas diluições seriadas em *Brain Heart Infusion* suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de hemina suína e 0,1% de menadiona (BHI-S). Uma alíquota de 0,1 ml de

cada diluição foi cultivada em BHIA-S/E para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)/ml da cultura crescida em BHI-S, após 48 horas de incubação em anaerobiose.

5.4 Determinação da citotoxicidade de AHB e AHA

Para verificar o efeito do AH na viabilidade celular, AHB e AHA em concentrações variando de 0,025% a 0,2% foram adicionados a CMSP e incubados por 16 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de MTT e à quantificação de células apoptóticas e necróticas pelo kit Anexina V/7AAD (Biolegend).

Para avaliação da atividade mitocondrial, foi utilizado o kit MTT-Assay. Foram adicionados 20 µL da solução de MTT e as células foram incubadas a 37°C por 16 horas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de SDS 10% em cada poço da placa de 96 poços, fundo em “U”, para solubilização dos cristais de formazan e as placas foram lidas após 4 horas em leitor de ELISA à 570 nm.

Para quantificação das células mortas por necrose ou apoptose foi utilizado kit Anexina V/7AAD (BioLegend, San Diego, CA, USA), o qual permite a marcação das células em apoptose pela anexina V conjugada a fluorocromo e marcação das células mortas totais pela incorporação aos fragmentos de DNA do 7AAD. As marcações foram realizadas conforme instruções do fabricante e a leitura realizada em citômetro de fluxo. Ao subtrairmos o número de células mortas totais (7AAD positivas) pelo número de células mortas por apoptose (anexina V positivas) obtemos o número de células mortas por necrose.

Os resultados obtidos por meio de ambas as metodologias mostraram que a incubação com as diferentes concentrações de AHA ou AHB não afetou significativamente a viabilidade celular de CMSP. Dessa forma, foi escolhida a maior concentração de AHA e AHB testada, 0,2%, para os experimentos de imunomarcação.

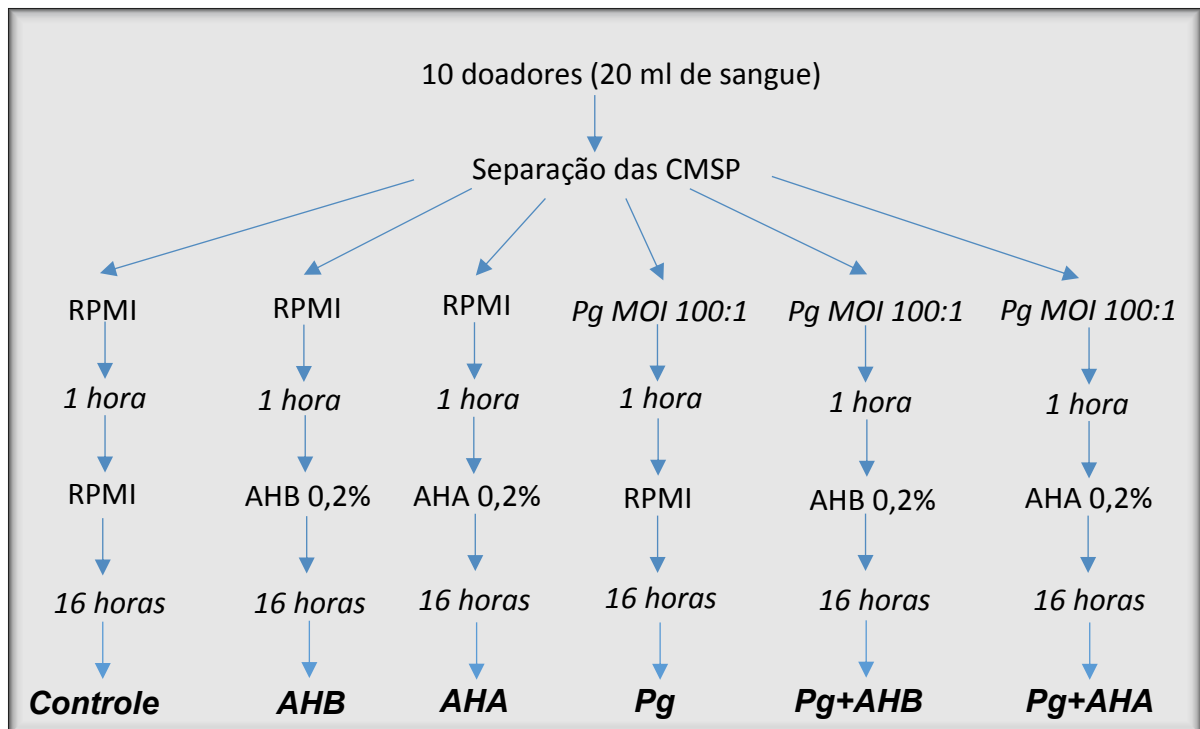
5.5 Estimulação de células mononucleares de sangue periférico com AH e *P. gingivalis*

Para verificar o efeito do AHB e do AHA nas características fenotípicas e funcionais de monócitos, 2x10⁵ CMSP por poço de placa de 96 poços de fundo em “U” foram incubadas com AHB ou AHA em concentração final de 0,2%, por 16 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. A concentração de AH utilizada no presente estudo foi determinada em experimentos de padronização, obtendo-se a maior concentração de AHA capaz de manter o meio líquido, sem causar alteração significativa da viabilidade celular das CMSP.

Com o objetivo de avaliar o efeito de componentes celulares de bactérias envolvidas na etiopatogênese da doença periodontal, as CMSP foram previamente incubadas por 1 hora em estufa a 37°C, 5% CO₂, com *P. gingivalis*, na proporção MOI de 100:1. Em seguida foram adicionados AHB ou AHA em concentração final de 0,2% e as células incubadas por mais 16 horas. A proporção de MOI (*multiplicity of infection*) utilizada no presente estudo foi determinada previamente a partir da incubação de CMSP com diferentes concentrações de *P. gingivalis* e análise da morte celular e da produção de citocinas. Foi escolhida a proporção que não alterou significativamente a morte celular, pelo método de marcação por anexina V/7AAD, e induziu aumento significativo nas frequências de monócitos produtores de TNF- α e IL-1, pelo método de citometria de fluxo (dados não mostrados).

Desse modo, foram obtidos os seguintes grupos experimentais: **Controle** (CMSP + meio RPMI), **AHB** (CMSP + meio RPMI + ácido hialurônico de baixo peso molecular 0,2%), **AHA** (CMSP + meio RPMI + ácido hialurônico de alto peso molecular 0,2%), **Pg** (CMSP + *P.gingivalis* MOI 100:1), **Pg+AHB** (CMSP + *P.gingivalis* MOI 100:1 + ácido hialurônico de baixo peso molecular 0,2%) e **Pg+AHA** (CMSP + *P.gingivalis* MOI 100:1 + ácido hialurônico de alto peso molecular 0,2%) (Fig. 1).

Figura 1: Fluxograma da metodologia de estimulação de células mononucleares de sangue periférico com *P. gingivalis* e ácido hialurônico para imunomarcagem e análise citométrica



Fonte: Elaborado pelo autor

5.6 Reações de imunofluorescência e citometria de fluxo

O protocolo para as imunomarcações foi realizado com base no descrito por Souza et al. (2007), com algumas modificações. Para marcação de antígenos de superfície celular, após centrifugação da placa, foram adicionadas soluções contendo anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, diluídos em PBS 0,015 M, pH 7,4, contendo 0,01% de azida e 0,2% de albumina bovina sérica (BSA) e realizada incubação por 15 minutos, à 4°C. Foram utilizados anticorpos anti-CD14 (ef450, Clone 61D3, eBioscience), CD16 (APCCy7, Clone 3G8, Biolegend), CD40 (FITC, Clone 5C3, Biolegend), CD80 (FITC, Clone 2D10, Biolegend), CD86 (PE, Clone IT2.2, eBioscience) e HLA-DR (PeCy5.5, Clone TU36, BD), TLR2 (PE, Clone TL2.1, eBioscience), TLR4 (APC, Clone HTA125, Biolegend). Em seguida, as células foram lavadas com PBS e analisadas em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Para marcação intracitoplasmática de citocinas, as células foram primeiramente incubadas por 15 minutos, a 4°C, com anticorpos anti-CD14 (ef450, Clone 61D3, eBioscience), CD16 (APCCy7, Clone 3G8, Biolegend), diluídos em PBS 0,015 M, pH 7,4, contendo 0,01% de azida e 0,2% de albumina bovina sérica (BSA). As células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com saponina 0,5% (Sigma-Aldrich) e incubadas com anticorpos monoclonais anti-IL-1 (FITC, Clone JK1B-1, Biolegend), IL-6 (APC, Clone MQ2-13A5, Biolegend), IL-10 (PE, Clone JES3-19F1, Biolegend), IL-12 (PE, Clone C11.5, Biolegend), TNF- α (ALX700, Clone MAb11, eBioscience), por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as células foram analisadas em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Análises citométricas foram realizadas utilizando-se o software FlowJo X (Tree Star Inc., USA). Nos gráficos granulosidade *versus* CD14, foram selecionadas as populações de monócitos CD14⁺. Dentro desta população, foram selecionadas ainda as subpopulações de monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺) e de monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), com base na expressão de CD16. A quantificação das frequências de células positivas para cada molécula de superfície e para cada citocina avaliada, bem como a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) para cada marcador, foram determinadas dentro da população total de monócitos CD14⁺ e dentro de cada subpopulação monocítica selecionada.

5.7 Análise estatística

O teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov mostrou distribuição normal dos dados. Para verificar a existência de diferenças entre os diferentes tratamentos na expressão de moléculas de superfície e de citocinas foi utilizado o teste ANOVA um critério sem repetição, seguido pelo teste "post hoc" de Tukey para comparação entre pares, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

6 ARTIGO CIENTÍFICO 1

O artigo intitulado **“Effect of hyaluronic acid high and low molecular weight on expression of surface molecules in human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*”** será submetido ao periódico Journal of Periodontology (Qualis A1).

Effect of hyaluronic acid high and low molecular weight on expression of surface molecules in human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*

Edson Costa e Silva^a, Luara Isabela dos Santos^b, Lis Ribeiro do Vale Antonelli^b, Natália Rocha Guimarães^c, Paula Prazeres Magalhães^c, Luiz de Macêdo Farias^c, Márcia Almeida Lana^d, Rodrigo Villamarim Soares^a, Martinho Campolina Rebello Horta^a, Paulo Eduardo Alencar Souza^a.

^a Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Laboratory of Biology and Immunology of Infectious and Parasitic Diseases, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c Oral Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^d Microbiology Laboratory, Biological and Health Sciences Institute, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author: Paulo Eduardo Alencar Souza. Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of 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

Background: Hyaluronic acid (HA) has been used as an adjunct in the treatment of periodontal disease. HA molecules of different molecular weights act on immunocompetent cells, inducing differentiation, activation, migration, and production of inflammatory mediators. The aim of this study was to evaluate the effect of HA high and low molecular weight in the expression of costimulatory molecules and Toll-like receptors in human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 donors, stimulated with *P.gingivalis* (Pg) were incubated with high HA (HHA) or low HA (LHA) molecular weight of 0.2%. Immunofluorescence reactions and flow cytometry were performed for detection of CD40, CD80, CD86, HLA-DR, TLR2 and TLR4 on CD14⁺ monocytes and subpopulations of classical monocytes (CD14⁺CD16⁻) and intermediate monocytes (CD14⁺CD16⁺).

Results: HHA and LHA increased expression of TLR2 in CD14⁺ monocytes and the classical monocytes. As HHA increased expression of CD40, HLA-DR and TLR2 in the intermediate population. Monocytes incubated with HHA intermediate exhibited higher expression of CD40 and HLA-DR those incubated with LHA.

Conclusion: HA is able to alter the phenotype of different monocytes subpopulations stimulated by periodontopathogens and this effect, in part, it depends on the molecular weight of the HA. The antiinflammatory effect of HA used topically in the periodontal tissues, seems to be dependent on the modulation of the activation of immunocompetent cells, since HHA induced upregulation of molecules involved in cellular activation.

Keywords: Hyaluronic Acid; Monocytes; *Porphyromonas gingivalis*; Costimulatory molecules; Toll-like receptors.

INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is an glycosaminoglycan present in extracellular matrix which plays a crucial role in the post-inflammation tissue repair, facilitating the migration and cell differentiation through cell signaling and interaction with growth factors present in the interstitium.^{1,2} HA also participates in the regulation of osmotic pressure and tissue lubrication, helping to maintain structural integrity and homeostasis of tissues.^{2,3} Its molecules can be low molecular weight (20 kD) or high molecular weight (3,000-4,000 kDa).⁴ The high molecular weight molecules have tissue fill function and exhibit immunosuppressive action. Low molecular weight HA molecules are involved in ovulation, embryogenesis and angiogenesis.⁵

HA has been used as gel for topical application, acting as adjunctive antimicrobial in scaling and root planing, in bone regeneration in periodontal bone defects in the guided bone regeneration or for the non-surgical treatment of peri-implant pockets.² Studies have shown that topical application of HA gel reduced the inflammation and edema in patients with gingivitis⁶ and reduced inflammation, plaque index, bleeding and probing depth in treating periodontal disease.⁷⁻⁹

Porphyromonas gingivalis is a Gram-negative bacterium highly pathogenic that has lypopolissacarides (LPS) as a major virulence factor and is closely associated with periodontitis.¹⁰ The *P. gingivalis* LPS appears to be able to activate the immune system via Toll-like receptors 2 (TLR2) and 4 (TLR4), expressed in macrophages and dendritic cells, by stimulating the production of various inflammatory mediators such as cytokines and activating surface molecules.¹¹

Further TLRs, professional antigen presenting cells (APCs) such as monocytes/macrophages and dendritic cells express many molecules involved in antigen presentation and costimulation for T lymphocytes, connecting innate immunity in the

acquired immunity.¹² Molecules of the major histocompatibility complex class II (MHC II) as HLA-DR associated to peptide antigen interact with T cell receptor (TCR) on the surface of helper T lymphocytes by sensitizing them.¹³ However, for effective activation of lymphocytes are necessary costimulatory signals. Among the co-stimulatory molecules on APCs, CD80 and CD86 share similar functions to bind to CD28 or CTLA-4 molecules on the surface of T lymphocytes, generating activation signals or inhibition of lymphocyte activation, respectively.¹⁴ Another important costimulatory signal of effector T lymphocytes and macrophages is the interaction between CD40 and CD40L. CD40L is a transmembrane protein of the family of tumor necrosis factor, which is present on activated T lymphocytes and interacts with CD40 expressed on the surface of APCs.^{15,16} This interaction is crucial for the activation of microbicidal mechanisms of macrophages, important for protection against intracellular agents. The CD40-CD40L interaction also enhances antigen presentation and activation, proliferation and differentiation of T lymphocytes.¹⁷

The existence of different populations of monocytes in human blood is well established. Besides the classic monocytes, which are strongly positive for CD14 surface molecule (CD14⁺⁺) and negative for CD16, a population of monocytes has been identified as intermediates, co-expressing CD16 and low levels of CD14 (CD14⁺CD16⁺)¹⁸ with particular phenotypic and functional characteristics.¹⁹ These cells exhibit more proinflammatory profile, high expression of proinflammatory cytokines and antigen presentation capacity.²⁰ The pattern of monocytes surface markers in many respects resembles the pattern observed in tissue macrophages.¹⁹

Although it has been proposed that HA acts as an antimicrobial in periodontal tissues,²¹ there are no studies evaluating possible effects in the modulation of immunocompetent cells stimulated by periodontopathogens. Considering also that different molecular weights HA act differently in cellular functions, the aim of this study was evaluate

the HA effect of high and low molecular weight in the expression of surface molecules involved in the control of inflammatory responses by human monocytes stimulated with *P. gingivalis*.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples and ethical aspects

Were included in this study, ten healthy donors, aged between 30 and 60 years who did not have any reported systemic disease, who were not immunocompromised and did not use medication that interfere with immunoinflammatory response or antimicrobial topical, and mouthwashes. This study was approved by the Research Ethics Committee of PUC Minas (CAAE: 54227916.0.0000.5137) and conducted in accordance with current regulations.

They were collected 20 ml of blood from each donor in heparinized tubes (Becton Dickinson Vacutainer™, USA) and those applied on 20 ml of Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC). After centrifugation at 200g for 40 minutes at 20°C, PBMC were harvested, washed with RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Aldrich). After cell counts with Trypan Blue (0.4%) in Countess Automated Cell Counter™ (Invitrogen) device, PBMC were resuspended in complete medium.

Hyaluronic acid

In this study, we used hyaluronic acid of low molecular weight (LHA) (33 kDa) (GLR001, lot # 1467153, R & D Systems) and hyaluronic acid high molecular weight (HHA) (1.46 x 10⁶ Da) (GLR002, lot # 1490155, R & D Systems), both with endotoxin level of <0,01EU/ml. HA diluted solutions were prepared in RPMI supplemented with 2 mM L-glutamine and 5% normal human serum (complete RPMI) immediately before use.

Preparation of bacteria

Lineage of *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 25611) was grown in Brain Heart Infusion Agar, supplemented with 0.5% yeast extract, 0.1% porcine hemin and 0.1% menadione, pH 7.2, supplemented with 5% sheep blood (BHIA-S/E). The microorganisms were incubated in anaerobic stove with an atmosphere of 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂ at 37°C for 72 hours. For quantification of the bacterial culture, serial dilutions were made in brain heart infusion supplemented with 0.5% yeast extract, 0.1% porcine hemin and 0.1% menadione (BHI-S). An aliquot of 0.1 ml of each dilution was grown on BHIA-S/E to determine the colony forming units (CFU)/ml culture grown in BHI-S after 48 hours of incubation in anaerobiosis.

Evaluation of the cytotoxicity of HHA and LHA

To determine the concentration of HA to be used in immunofluorescence experiments in monocytes, patterning experiments were conducted by adding HHA or LHA in concentrations ranging from 0.025% to 0.2% to the PBMC and incubated for 16 hours at 37°C, 5% CO₂. For evaluation of mitochondrial activity, we used the MTT-Assay kit according to manufacturer's instructions and read the absorbance at 570 nm. To quantify cells killed by necrosis or apoptosis Annexin V/7-AAD Kit (BioLegend, San Diego, CA, USA) was used, according to manufacturer's instructions and the cells analyzed by flow cytometry.

Analyzes of the mitochondrial cell death activity showed no differences in cell viability between the concentrations tested for both HA. Thus, for use in immunofluorescence experiments, it has chosen the highest concentration of HHA (0.2%) able to keep the medium fluid, without a significant change in cell viability of PBMC. Figure 1 shows representative dot plot graphs of cytometric analysis of Annexin V and 7-AAD.

Stimulation of peripheral blood mononuclear cells with HA and *P. gingivalis*

To verify the effect of HHA and LHA the phenotypic and functional characteristics of monocytes, 2×10^5 PBMC per well of plate bottom 96-well "U" were incubated with HHA or LHA in final concentration of 0.2%, for 16 hours, at 37°C, 5% CO₂.

Aiming to evaluate the microbial stimulation sites in periodontal disease, PBMC were preincubated for 1 hour at 37°C, 5% CO₂ with *P. gingivalis* in proportion MOI of 100:1. Then HHA or LHA were added in 0.2% final concentration and the cells incubated for a further 16 hours. The ratio of MOI (multiplicity of infection) used in this study was previously determined from the PBMC incubation with different concentrations of *P. gingivalis* and analysis of cell death and cytokine production. The MOI of 100:1 did not significantly alter cell death and induced a significant increase in the frequency of monocytes producing TNF- α and IL-1 (data not shown).

The following experimental groups of PBMC were obtained: control (RPMI), LHA (hyaluronic acid low molecular weight 0.2%), HHA (hyaluronic acid high molecular weight 0.2%), Pg (*P. gingivalis*), Pg-LHA (*P. gingivalis* + hyaluronic acid low molecular weight 0.2%) and Pg-HHA (*P. gingivalis* + hyaluronic acid high molecular weight 0.2%).

Immunofluorescence reactions and flow cytometry

The protocol for immunofluorescence reactions and flow cytometry was based on that described by Souza et al.²², with some modifications. For labeling of cell surface antigens fluorochrome conjugated monoclonal antibodies diluted in PBS 0.015 M, pH 7.4, containing 0.01% azide and 0.2% bovine serum albumin (BSA) were added to PBMC and incubation carried out for 15 minutes at 4°C. The antibodies anti-CD14 (ef450 Clone 61D3, eBioscience), CD16 (APCCy7, Clone 3G8, BioLegend), CD40 (FITC, clone 5C3, BioLegend), CD80 (FITC, clone 2D10, BioLegend), CD86 (PE, clone IT2.2, eBioscience)

and HLA-DR (PeCy5.5 Clone Tu36, BD), TLR2 (PE, clone TL2.1, eBioscience), and TLR4 (APC, clone HTA125, BioLegend) were used. After incubation, the cells were washed with PBS, fixed with a 2% formaldehyde solution in PBS, for 20 minutes at room temperature, and analyzed on a flow cytometer (LSRFortessa™, Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Cytometric analyzes were performed using the FlowJo X software (Tree Star Inc., USA). In the dot plot graphs granularity versus CD14, populations of CD14⁺ monocytes were selected. Within this population, although been selected subpopulations of intermediate monocytes (CD14⁺CD16⁺) and classical monocytes (CD14⁺CD16⁻), based on expression of CD16. The quantification of the frequency of positive cells assessed for each surface molecule as well as the median fluorescence intensity (MFI) for each marker were determined within the total population of CD14⁺ monocytes and within each monocyte subpopulation selected.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov normality test showed normal distribution of data. To verify the existence of differences between the different treatments on the expression of surface molecules the one-way ANOVA without repeated measures, followed by the test "post hoc" Tukey to compare pairs with 5% significance level. The analyzes were performed using the software GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

The cytometric analysis of surface molecule expression on CD14⁺ monocyte population showed that incubation with HHA or LHA did not significantly alter the frequency of cells expressing CD40, CD80, CD86 or HLA-DR, or the median intensity of fluorescence of these molecules (Fig. 2). However, incubation with HHA or LHA significantly increased

frequency of CD14⁺ monocytes expressing TLR-2 and the median intensity of fluorescence of this molecule although it decreased the frequency of cells expressing TLR-4, as well as the median intensity of fluorescence of this marker (Fig. 3).

Incubation with *P. gingivalis* significantly increased frequency of CD14⁺ monocytes expressing CD40, CD80, HLA-DR and TLR-2, as well as the median intensity of fluorescence of these molecules in this population (Fig. 2 and 3). Although it has not significantly changed the frequencies of CD14⁺ monocytes expressing CD86 and TLR-2, incubation with *P. gingivalis* reduced median intensity of fluorescence of these surface molecules in this population (Fig. 2 and 3).

The addition of HHA or LHA to CD14⁺ monocytes previously stimulated with *P. gingivalis* was not able to significantly alter the frequency of cells expressing CD40, CD80, CD86, HLA-DR or TLR-4 or the median intensity of fluorescence of these molecules (Fig. 2 and 3). However, addition of HHA or LHA significantly increased frequency of CD14⁺ monocytes expressing TLR-2 and the median fluorescence intensity of this molecule in cells stimulated with *Pg* (Fig. 3).

Comparing effects of hyaluronic acid with stimulation with *P. gingivalis* in the CD14⁺ monocyte population, the reduction of the frequencies and the median intensity of fluorescence of TLR-4 was similar between HHA, LHA and *Pg* groups (Fig. 3).

Analysis of CD16 expression in the CD14⁺ monocyte population showed that the addition of *Pg* significantly reduced the frequency of cells expressing this molecule (Fig. 4).

Considering the expression of the markers in the subpopulation of CD14⁺CD16⁺ monocytes, the cytometric analysis showed that the frequency of cells expressing CD80 or HLA-DR were significantly higher in HHA group compared to the LHA group (Fig. 5). Furthermore, the addition of HHA or LHA increased the TLR-2 median intensity of fluorescence compared to the control group (Fig. 6).

The stimulation of *Pg* significantly increased the frequency monocytes CD14⁺CD16⁺ cells expressing CD40, CD80 and HLA-DR and the median intensity of fluorescence of these molecules (Fig. 5). In contrast, stimulation with *Pg* reduced frequency of CD14⁺CD16⁺ monocytes expressing TLR-4 and median intensity of fluorescence of CD86, TLR-2 and TLR-4 (Fig. 5 and 6). The addition of HHA to cells stimulated with *Pg* significantly increased frequency of CD14⁺CD16⁺ monocytes expressing HLA-DR and TLR-2 and the median intensity of fluorescence of CD40, HLA-DR and TLR-2 in this subpopulation (Figs. 5 and 6). Comparing the two types of hyaluronic acid in cells stimulated with *P. gingivalis*, the frequency of CD14⁺CD16⁺ monocytes expressing HLA-DR and median intensity of fluorescence of CD40 and HLA-DR were significantly higher in HHA group than LHA group (Fig. 5).

Considering the CD14⁺CD16⁻ subpopulation of monocytes, addition of HHA or LHA significantly increased the TLR-2 median intensity of fluorescence (Fig. 8). Conversely, the addition of HHA or LHA significantly reduced the frequency TLR-4 expressing cells and the median intensity of fluorescence of this molecule (Fig. 8).

Stimulation with *P. gingivalis* increased the frequency of CD14⁺CD16⁻ monocytes expressing CD40, CD80 and HLA-DR as well as the median intensity of fluorescence of these molecules and CD86 (Fig. 7). In contrast, *P. gingivalis* reduced the frequency of TLR-4⁺ cells and the median intensity of fluorescence of CD86, TLR-2 and TLR-4 in this subpopulation of monocytes (Fig. 8). The addition of HHA or LHA significantly increased median intensity of fluorescence for TLR-2 in the subpopulation of CD14⁺CD16⁻ monocytes stimulated with *P. gingivalis* (Fig. 8).

DISCUSSION

Several studies have shown satisfactory clinical effects of HA use as an adjunct in the treatment of gingivitis and periodontitis, reducing tissue inflammation.^{6,9,23} However, the molecular and cellular mechanisms by which acts HA in inflamed periodontal tissues have not yet been described. In the present study, the cytometric analysis showed that HHA or LHA were able to increase the frequency of CD14⁺ monocytes expressing TLR2 and the median intensity of expression of this molecule and to reduce the frequency and the intensity of expression of TLR4 in this cell population. Monocytes are important circulating cells in immunoinflammatory response, being recruited for bacterial infection sites and participating in combat processes to microorganisms and tissue repair induction.²⁴ These processes involve cell signaling receptors by microbial products, co-stimulatory molecules and cytokines, which stimulate and modulate the cellular responses to microbial infection.^{24,25}

Studies have shown that *P. gingivalis* is identified by cells of the innate immunity mainly by means of interaction with TLR2, both *in vitro* and *in vivo*, whereas TLR4 does not play such an important role detection due to the fact that bacteria expressing atypical lipopolysaccharide molecules.^{26,27} Although *P. gingivalis* not directly antagonize TLR2, this pathogen has developed strategies to explore the TLR2 signaling on his own advantage. The binding to TLR2 activates two distinct signaling pathways: a pathway dependent on MyD88 leading to induction mostly proinflammatory and antimicrobial responses, that depends on the nuclear factor kB, and one that involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase and leads to induction of CR3 expression on leukocytes.^{28,29} This last way, called pro-adhesive, is started when the *P. gingivalis* fimbriae bind to CD14 and activate TLR2 mediated signaling, increasing the interactions between leukocytes and endothelial cells, and transendothelial migration.¹⁰ Although this signaling pathway contributes to the leukocyte recruitment into sites of bacterial infection, evidence suggests that *P. gingivalis* use this route to improve the

interaction of their cell surface with fimbriae CR3 receptors expressed on inflammatory cells.¹⁰

Whereas the activation of microbicidal mechanisms of leukocyte recruitment and activation of TLR2 induced by *P. gingivalis*, the stimulation of this receptor expression by HHA and LHA in monocytes detected in this study could contribute to more efficient in fighting microbial periodontal tissues. In contrast, the reduction of TLR4 expression could contribute to the control of cell activation by reducing pro-inflammatory activity of monocytes against other bacteria, assisting in clinical improvement of patients in surgical periodontal therapy and supportive.

Monocytes represent about 10% of circulating leukocytes.³⁰ Three decades ago, human monocytes were classified into two subpopulations according to the expression of FcγR (Fc gamma receptors) in: classical monocytes (CD14⁺CD16⁻), which express the high affinity receptor for IgG (FcγRII), and inflammatory monocytes (CD14⁺ CD16⁺), those expressing low affinity receptors for IgG (FcγRIII).¹⁹ Recently, a new classification has been proposed, based on functional characteristics, according to expression of CD14 and CD16 molecules on classical monocytes (CD14⁺CD16⁻), nonclassical (CD14^{low}CD16⁺) and intermediate (CD14^{high}CD16⁺).³¹ The classical monocytes are present in larger amounts in human peripheral blood, accounting for about 80 to 95% of total monocytes.^{32,33} They exhibit high phagocytic and microbicide capacity,³⁴ increased expression of CCR2 chemokine receptor compared to other monocytic subpopulations,³⁵ and although they express least HLA-DR than intermediate subpopulation of monocytes, they are good for activating CD4⁺ T cells.^{32,36} Since the subsets of intermediate monocytes have a higher stage of cell differentiation, they are committed to differentiation to dendritic cells or macrophages³⁷ and exhibit moderate phagocytic activity.³⁶ Some studies show the clinical importance of CD16⁺ monocytes, which are more activated in inflammatory and infectious processes³⁸⁻⁴⁰ and show

high expression of CCR5, CCR2 and CX3CR1 chemokine receptors as shown in hepatic cirrhosis.⁴¹ The recruitment of these monocytes by expression of these chemokine receptors has been implicated in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, atherosclerosis, HIV infection and malaria, consisting of an important factor in the regulation of inflammatory responses.^{20,42}

In the present study, we evaluated the subpopulations of classical monocytes (CD14⁺CD16⁻) and intermediate (CD14⁺CD16⁺). The addition of HHA or LHA did not significantly affect the expression of CD16, that is, they not affect the frequency of classical monocytes or intermediate subpopulations. Analysis of the expression of surface molecules on classical monocytes showed similar results to those observed for total CD14⁺ monocyte population. These data reflect the major contribution of this subpopulation of monocytes in total, because about 80% of the monocytes display the CD14⁺CD16⁻ phenotype. However, considering the subpopulation of intermediate monocytes, adding HHA or LHA did not significantly affect the expression of TLR4, as observed in classical subpopulation of monocytes.

Although these comprise a minor subpopulation of monocytes, the intermediates are possibly more easily recruited into inflammatory sites by increased expression of chemokine receptors,^{41,43} contributing to the formation of the inflammatory infiltrate. It has been shown that the majority of mononuclear phagocytes in the inflamed gingiva expressed the chemokine CCL2 and this expression correlates with the intensity of gingival inflammation.⁴⁴

Phenotypic and functional differences of this monocyte subpopulation could explain the lack of susceptibility to the inhibitory effect on TLR4 expression induced by HHA and LHA shown in the classical monocytes. Moreover, in this study, the subset of intermediate monocytes shown to be more sensitive to the action of HA in the expression of antigen-presenting and co-stimulatory molecules. The HHA-treated group showed higher frequencies of intermediate monocytes expressing CD80 and HLA-DR than the LHA-treated group. These molecules are directly involved in the activation of cellular acquired immune response.

HLA-DR is an isotype of the class II major histocompatibility complex (MHC II) whose increased expression is indicative of activation of professional antigen presenting cells (APCs).¹³ The interaction between MHC-II-antigen to T cell receptor (TCR) is required for lymphocyte sensitization.⁴⁵ However, in T cell activation is required also the connection of costimulatory molecules such as CD80 or CD86, expressed by APCs, with CD28 expressed on the surface of lymphocytes.⁴⁶ Based on the present results, exposure of intermediate monocytes to HHA would increase the CD4⁺ T cell activation contributing to the anti microbial capacity of acquired immunity.

Considering that immunocompetent cells are exposed to bacterial products in the tissues affected by periodontitis, in this study, PBMC were previously stimulated with *P. gingivalis*, a periodontopathogen commonly found in periodontal disease sites.¹⁰ Flow cytometric analysis showed that *P. gingivalis* stimulus increased the frequency of classical monocytes and reduced the frequency of intermediate monocytes. A recent study showed that stimulation with LPS of *Escherichia coli* induces greater inflammatory response by human monocytes intermediate than by classical monocytes.⁴⁷ These findings suggest that subpopulations of monocytes differently respond to distinct pathogens.

This study also showed that *P. gingivalis* stimulation significantly increased the expression of CD40, CD80 and HLA-DR, although it reduced the expression of CD86, TLR4 and TLR2 in CD14⁺, classical and intermediate monocyte populations. These data suggest that the different subpopulations of monocytes evaluated are capable of responding to stimulation with *P. gingivalis* in relation to expression of costimulatory molecules and Toll-like receptors.

The analysis of the effect of HA on mononuclear cells previously stimulated with *P. gingivalis* showed that addition of HHA or LHA increased the frequency of CD14⁺ monocytes expressing TLR2 and the intensity of expression of this molecule in the CD14⁺

population and the subpopulation of classical monocytes, reversing the reducing expression of this receptor induced by *P. gingivalis*. In the subpopulation of intermediate monocytes only HHA was able to increase the frequency of TLR2⁺ cells as well as the intensity of expression of this molecule. HHA increased the intensity of expression of CD40 and HLA-DR only in the subpopulation of intermediate monocytes. Furthermore, considering cells stimulated with *P. gingivalis*, the HHA-treated group showed higher intensities of expression of CD40 and HLA-DR as compared to the group treated with LHA. These data suggest that subpopulations of monocytes are differently susceptible to HA of different molecular weights, and probably these molecules interact with receptors on the cell surface, generating signals for the stimulation of the expression of TLR2, CD40 and HLA-DR. The interaction between CD40 and its ligand (CD40L) triggers specific responses in cells involved, usually by activating inflammatory signaling pathways.⁴⁸

The data from this study suggest a role of HA mainly of high molecular weight, to stimulate proinflammatory and microbicides mechanisms in monocytes activated by *P. gingivalis*. Thus, the anti-inflammatory mechanism of HA as an adjunct in the treatment of periodontal disease, appears to directly involve modulation of surface molecules responsible for cell signaling and control of periodontal immunoinflammatory processes. The increased expression of TLR2, primarily induced by high-molecular-weight HA could keep the cells more responsive to LPS from *P. gingivalis*. The TLR system detects *P. gingivalis* mainly through TLR2, both *in vitro* and *in vivo*, whereas TLR4 does not play such an important role due to the fact the pathogen expressing atypical lipopolysaccharide molecules.^{26,27} Studies by functional and cytokine production and other inflammatory mediators by monocytes exposed to HA are essential to confirm this hypothesis.

Although the literature show immunosuppressive and anti-inflammatory effects of high molecular weight HA,^{5,49} in the present study, this molecule was able to affect in *P.*

gingivalis stimulated monocytes by modulating the expression of molecules involved in the activation of T lymphocytes and monocytes. Thus, it is possible that high molecular weight HA plays activating immunoinflammatory mechanisms, which can contribute to the microbicidal activity of macrophages and monocytes in the periodontal tissues.

REFERENCES

1. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Apr;12(2):79-87.
2. Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res.* 2010 Oct-Dec;21(4):575-8.
3. Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis.* 1995 May; 54(5): 429–432.
4. Sadowitz B, Seymour K, Gahtan V, Maier KG. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *J Surg Res.* 2012 Apr;173(2):e63-72.
5. 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 Apr;10(4):1558-70.
6. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Göcke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol.* 2003 Feb;30(2):159-64.
7. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med.* 1997 Feb 3;185(3):393-403.
8. 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 Aug;16(4):1229-36.
9. Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul SI, Jentsch H. Hyaluronic Acid as an adjunct after scaling and root planning: a prospective randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2013 Jul;84(7):941-9.
10. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068.
11. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5041-51.
12. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):298-300.
13. Razma AG, Lynch JP 3rd, 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 Mar;129(3):419-24.

14. 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 Dec;1(9):793-801.
15. Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene Family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J*. 1992 Dec;11(12):4313-21.
16. Davidson DC, Hirschman MP, Sun A, Singh MV, Kasischke K, Maggirwar SB. Excess Soluble CD40L contributes to blood brain barrier permeability in vivo: implications for HIV-associated neurocognitive disorders. *PLoS One*. 2012;7(12):e51793.
17. Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*. 1995 Dec 7;378(6557):617-20.
18. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma*. 1988 Dec;7(6):521-7.
19. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2527-34.
20. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584-92.
21. Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Piloni A, Bernard GW. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):370-4.
22. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, 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. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1886-94.
23. Piloni A, Annibali S, Dominici F, et al. Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. *Ann Stomatol (Roma)*. 2011 Mar-Jun; 2(3-4):3-9.
24. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003 Jul;19(1):71-82.
25. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-52.

26. Hajishengallis G, Wang M, Harokopakis E, Triantafilou M, Triantafilou K. Porphyromonas gingivalis fimbriae proactively modulate beta-2 integrin adhesive activity and promote binding to and internalization by macrophages. *Infect Immun*. 2006 Oct;74(10):5658-66.
27. Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to Porphyromonas gingivalis: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J Immunol*. 2006 Dec 15;177(12):8296-300.
28. Harokopakis E, Hajishengallis G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur J Immunol*. 2005 Apr;35(4):1201-10.
29. Hajishengallis G, Wang M, Liang S. Induction of distinct TLR-2 mediated proinflammatory and proadhesive signaling pathways in response to porphyromonas gingivalis fimbriae. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6690-6.
30. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
31. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80.
32. Aguilar-Ruiz SR, Torres-Aguilar H, González-Domínguez E, et al. Human CD16+ and CD16- monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. *J Leukoc Biol*. 2011 Dec;90(6):1119-31.
33. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*. 2007 Aug;82(2):244-52.
34. Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immun*. 2010 Sep;33(3):375-86.
35. Zhao ZZ, Zhang HB, Chen Q, et al. Promotion of immunity of mice to Pasteurella multocida and hog cholera vaccine by pig interleukin-6 gene and CpG motifs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009 May;32(3):191-205.
36. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, et al. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011 Sep;118(12):e50-61.
37. Ancuta P, Liu KY, Misra V, et al. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics*. 2009 Aug 27;10:403.

38. Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G. Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011 Apr;4(2):211-9.
39. Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol*. 1995 Dec;25(12):3418-24.
40. Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S. CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 2000 Sep; 121(3): 566-70.
41. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, et al. Interleukin-8 activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One*. 2011;6(6):e21381.
42. Chimma P, Roussilhon C, Sratongno P, et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000631.
43. Antonelli LR, Leoratti FM, Costa PA, et al. The CD14⁺CD16⁺ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog*. 2014 Sep 18;10(9):e1004393.
44. Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *J Periodontol*. 1995 Jan;66(1):80-8.
45. Beutner U, Macdonald HR. TCR-MHC class II interaction is required for peripheral expansion of CD4 cells in a T cell-deficient host. *Int Immunol*. 1998;10(3):305-10.
46. Fields PE, Finch RJ, Gray GS, et al. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naïve CD8⁺ TCR-transgenic T cells. *J Immunol*. 1998 Nov 15;161(10):5268-75.
47. Thaler B, Hohensinner PJ, Krychtiuk KA, et al. Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Sci Rep*. 2016; 6: 30162.
48. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 2000;67(1):2-17.
49. Wang TW, Sun JS, Wu HC, Tsuang YH, Wang WH, Lin FH. The effect of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid skin substitute on wound healing in SCID mice. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(33):5689-97.

FIGURES

Figure 1 - Dot plot graphics representing the percentage of viable cells (double-negative for Annexin V and 7-AAD), apoptotic (Annexin⁺7AAD⁻) or necrotic cells (7-AAD⁺) in the population of PBMC incubated with different concentrations of HHA or LHA.

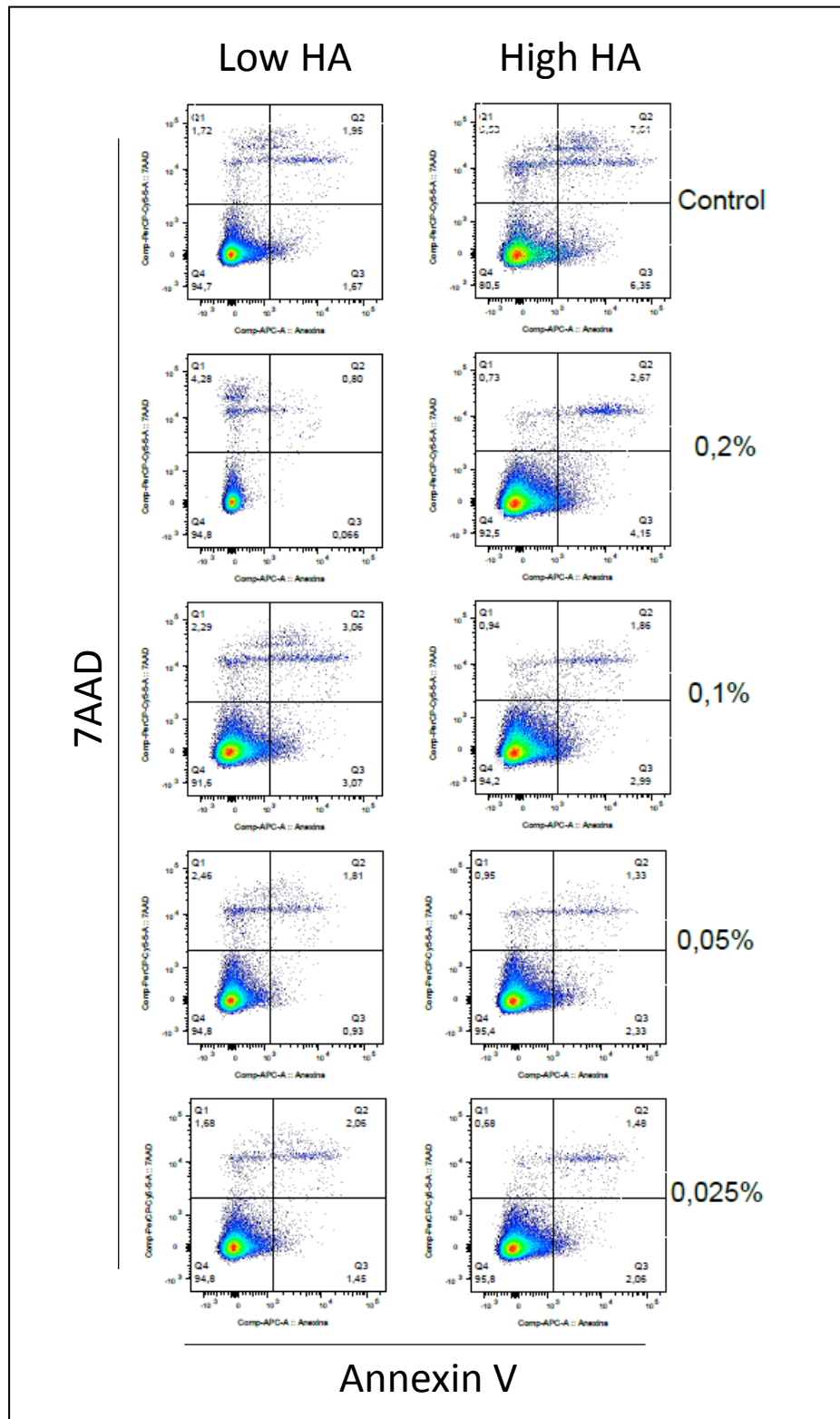


Figure 2 - Frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of surface molecules on CD14⁺ monocytes.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

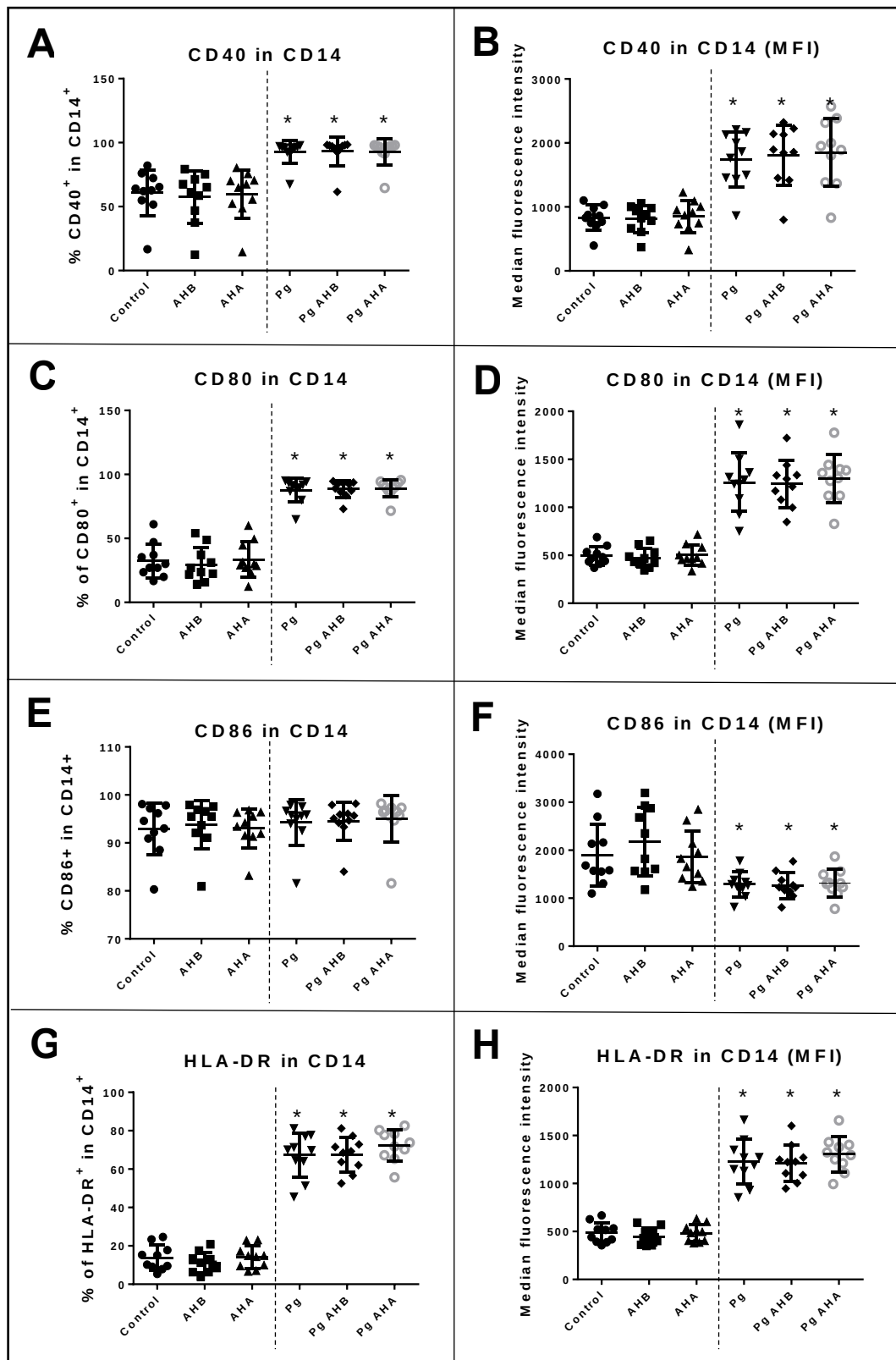


Figure 3 - Frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of TLRs in CD14⁺ monocytes.

* Indicates significant difference compared to control group.
a, b Lowercase letters represent significant differences between different treatments the cells not stimulated with *P. gingivalis* or between cells stimulated with *P. gingivalis*. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

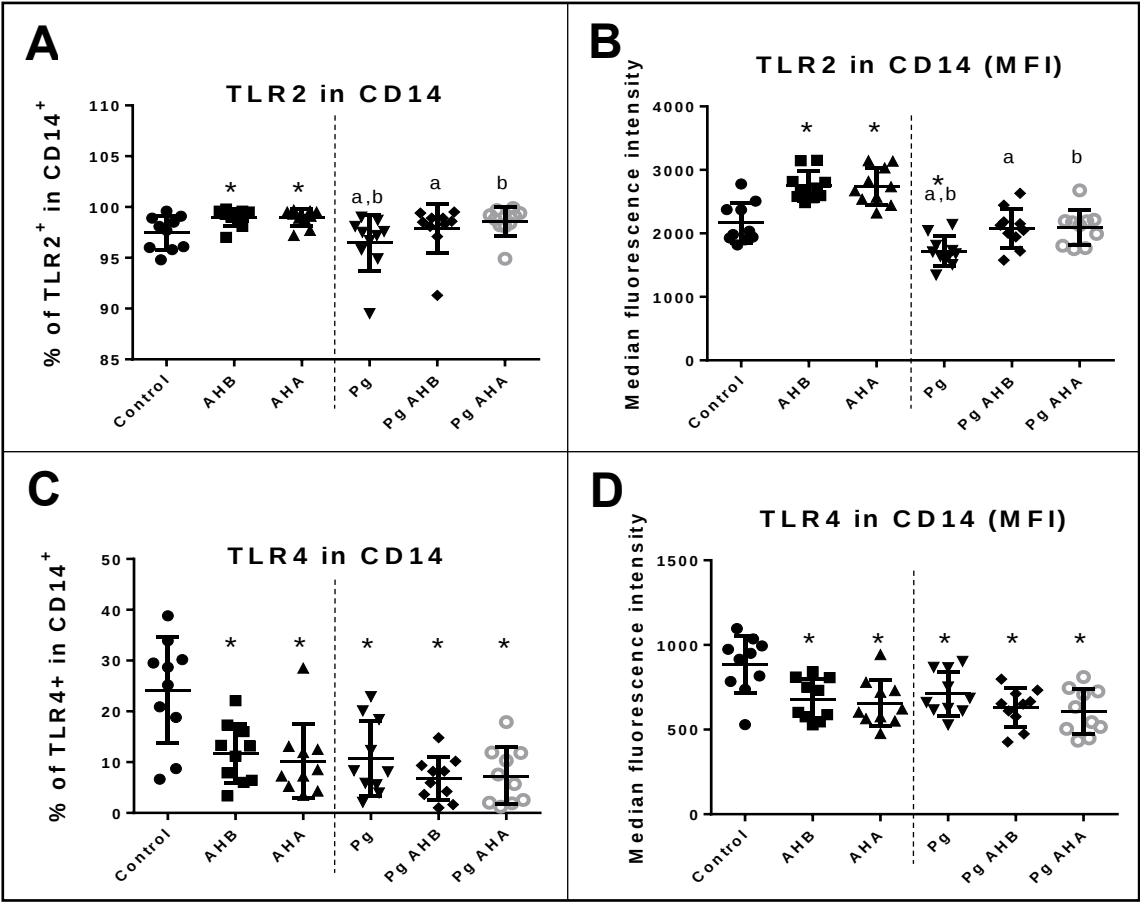


Figure 4 - Frequencies of CD16⁺ and CD16⁻ cells in CD14⁺ monocyte population.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by the Tukey post hoc test, with a 5% significance level

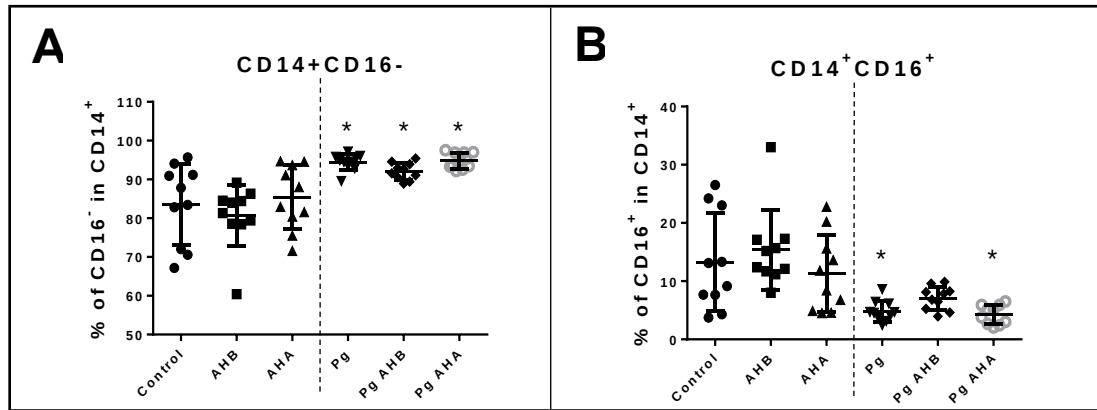


Figure 5 - Frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of surface molecules in CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

^{a,b,c} Lowercase letters represent significant differences between different treatments the cells not stimulated with *P. gingivalis* or between cells stimulated with *P. gingivalis*. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

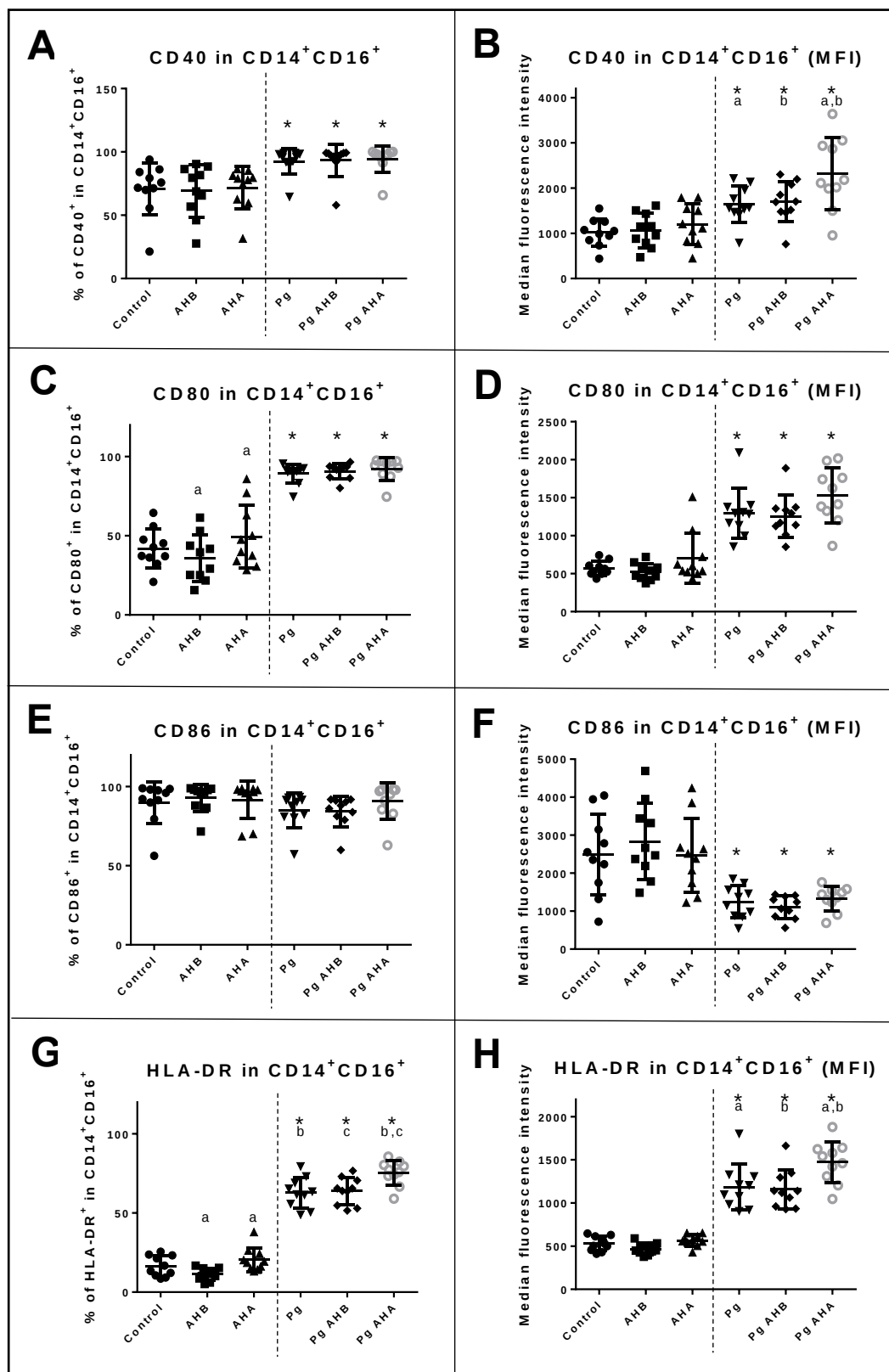


Figure 6 - Frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of TLRs in CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

^a Lowercase letter represent significant differences between different treatments the cells not stimulated with *P. gingivalis* or between cells stimulated with *P. gingivalis*. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

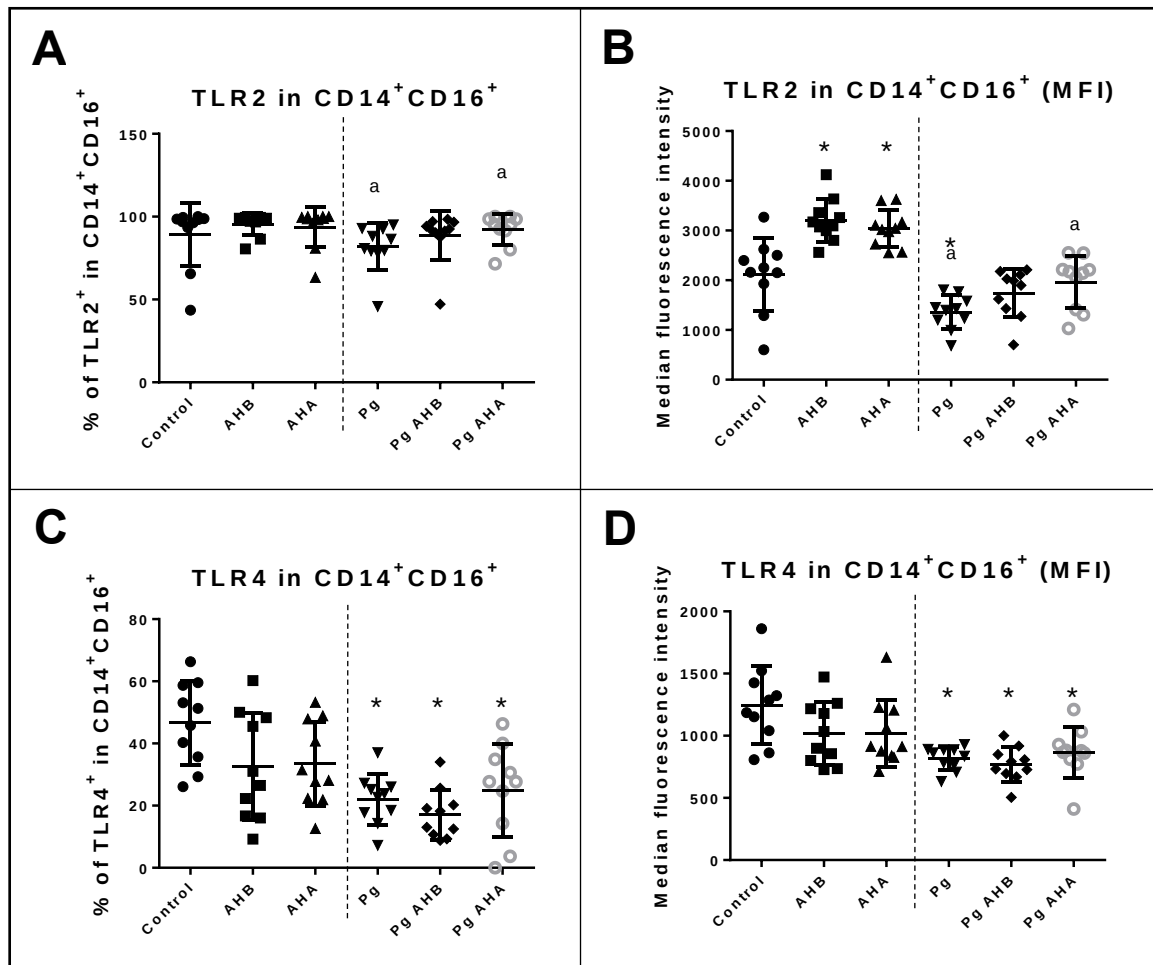


Figure 7 - Frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of surface molecules in CD14⁺CD16⁻ monocyte subpopulation.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

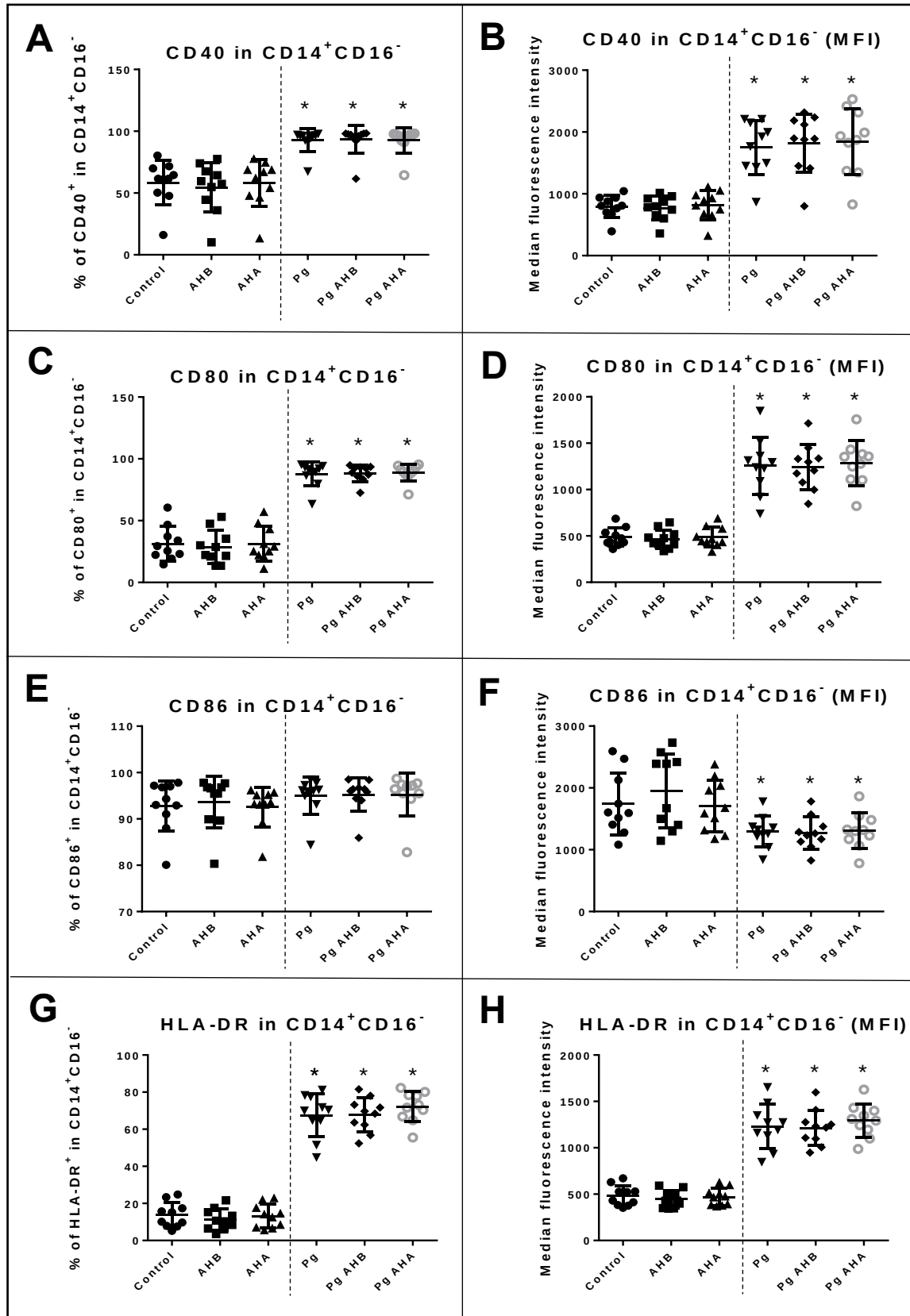
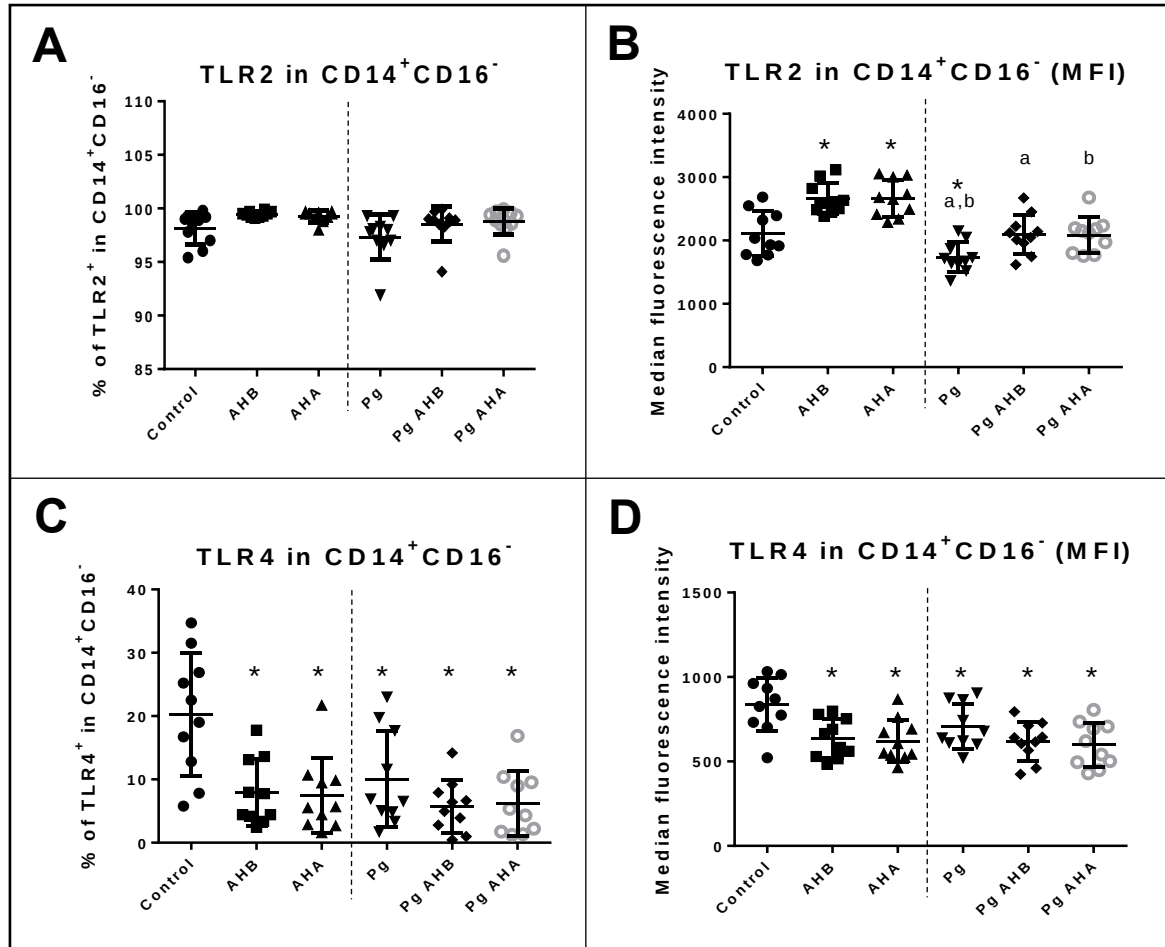


Figure 8 - Frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of TLRs in CD14⁺CD16⁻ monocyte subpopulation.

* Indicates significant difference compared to control group.

^{a, b} Lowercase letters represent significant differences between different treatments the cells not stimulated with *P. gingivalis* or between cells stimulated with *P. gingivalis*. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.



7 ARTIGO CIENTÍFICO 2

O artigo intitulado **“Effect of hyaluronic acid high and low molecular weight on cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*”** será submetido ao periódico Journal of Applied Oral Science (Qualis A2).

Effect of hyaluronic acid high and low molecular weight on cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*

Edson Costa e SILVA^a, Luara Isabela dos SANTOS^b, Lis Ribeiro do Vale ANTONELLI^b, Natália Rocha GUIMARÃES^c, Paula Prazeres MAGALHÃES^c, Luiz de Macêdo FARIAS^c, Márcia Almeida LANA^d, Rodrigo Villamarim SOARES^a, Martinho Campolina Rebello HORTA^a, Paulo Eduardo Alencar SOUZA^a

^a Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Laboratory of Biology and Immunology of Infectious and Parasitic Diseases, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c Oral Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^d Microbiology Laboratory, Biological and Health Sciences Institute, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding address: Paulo Eduardo Alencar Souza. Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of 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,

Email: pauloalencar@pucminas.br

ABSTRACT

Background: Hyaluronic acid (HA) has been used as an adjunct in the treatment of inflammatory periodontal diseases with significant results in reducing inflammation and tissue destruction. Although several studies have shown that HA interfere with biological processes such as inflammation, angiogenesis, cell differentiation and tissue repair and that these effects depend on his molecular weight, the mechanism by which HA improves the clinical and histological parameters of periodontal tissues has not yet been elucidated. The aim of this study was to evaluate the effect of high and low molecular HA weight on cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 donors were stimulated with *P. gingivalis* (Pg) and then incubated with high HA (HHA) or low HA (LHA) molecular weight. The expression of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α were assessed on total, intermediate and classical monocyte subpopulations phenotypically identified by CD14 and CD16 using flow cytometry. **Results:** In the absence of stimulation with Pg, HHA group showed higher frequencies of IL-1 β ⁺ and TNF- α ⁺ cells in the CD14⁺ and classical monocyte populations when compared to the LHA group. The addition of HHA and LHA to Pg stimulated cells was able to reverse the increase in IL-1 β expression induced by the bacteria only in the intermediate subpopulation of monocytes. **Conclusion:** HA affects differently the cytokine expression in different subpopulations of monocytes. Although HHA and LHA reduce IL-1 β expression in the intermediate monocytes stimulated with *P. gingivalis*, the anti-inflammatory effect in periodontal treatment seems to involve other mechanisms than direct modulation of cytokine production by immunocompetent cells.

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

INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is an important structural component present in the extracellular matrix of great importance in the post-inflammation tissue repair, contributing to migration and cell differentiation through signaling and interaction with growth factors present in the interstitium.^{4,43} Its molecules may be found in low molecular weight (20 kD) or high molecular weight (3,000-4,000 kDa).⁴¹ The high molecular weight molecules are components of the connective tissue extracellular matrix and exhibit immunosuppressive action. In contrast, low molecular weight HA molecules are involved in angiogenesis.¹³ and in the stimulation of proinflammatory cytokines production in various cell types.²⁴

HA is widely used in the treatment of inflammatory processes in the biomedical areas. In dentistry, its clinical use has shown anti-inflammatory, antibacterial and edema inhibition in the treatment of gingivitis.²⁴ In periodontal disease, the inflammatory process, increasing the amount of subgingival bacteria, increased pocket depth, attachment loss and destruction of adjacent tissues are identified.^{7,15} Between periodontal bacteria, *Porphyromonas gingivalis* is a gram-negative bacterium, highly pathogenic, and is closely associated with periodontitis.³³ LPS derived from *P. gingivalis* (Pg LPS) presents itself as an important virulence factor in periodontal disease.³³

The existence of different populations of monocytes in human blood is well established, based on functional characteristics, according to expression of CD14 and CD16 molecules on classical monocytes (CD14⁺CD16⁻), non-classical (CD14⁺CD16⁺), and intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺).⁴⁸

In response to microbial products recognized by Toll-like receptors (TLRs), leukocytes and tissue cells produce cytokines that participate in cellular communication in the inflammatory site and are involved in the proliferation, activation, inhibition, recruitment and cell death.^{9,12,14} The importance of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease is evident in several studies. They not only act as initiators and regulators of innate and adaptive immune response, but also activates the mechanisms that cause tissue damage, causing loss of function and clinical disease.^{2,44}

Previous studies have shown that HA molecules of different molecular weights may exhibit antagonistic effects.^{8,32,35} Its mechanism of action is as an antimicrobial agent or inducer of immunoinflammatory response or even acting as a physical

barrier, preventing the bacteria-cell interactions, it seems still not clear. Although it has been used in the treatment of gingivitis and periodontal disease, there are no studies in the literature evaluating their effects on cytokine production by cells stimulated with *P. gingivalis*. This study aimed to evaluate the effect of high and low molecular weight HA on the cytokines expression in human monocyte subpopulations stimulated with *P. gingivalis*.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples and ethical aspects

Ten healthy donors, aged between 30 and 60 years were included in this study. They did not have any reported systemic disease, were not immunocompromised and did not use medication that interfere with immunoinflammatory response or antimicrobial topical, and mouthwashes. This study was approved by the Research Ethics Committee of PUC Minas and conducted in accordance with current regulations.

They were collected 20 ml of blood from each donor in heparinized tubes (Becton Dickinson Vacutainer™, USA) and those applied on 20 ml of Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC). After centrifugation at 200g for 40 minutes at 20°C, PBMC were harvested and washed with RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Aldrich). After cell counts with Trypan Blue (0.4%) in Countess Automated Cell Counter™ (Invitrogen) device, PBMC were resuspended in complete medium (RPMI supplemented with 2 mM L-glutamine and 5% normal human serum).

Hyaluronic acid

Low molecular weight hyaluronic acid (LHA) (33 kDa) (GLR001, lot # 1467153, R&D Systems) and high molecular weight hyaluronic acid (HHA) (1.46 x 10⁶ Da) (GLR002, lot # 1490155, R&D Systems), both with endotoxin level of <0,01EU/ml, were used in the present study. HA diluted solutions were prepared in complete RPMI immediately before use.

Preparation of bacteria

Lineage of *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 25611) was grown in Brain Heart Infusion Agar, supplemented with 0.5% yeast extract, 0.1% porcine hemin and 0.1%

menadione, pH 7.2, supplemented with 5 % sheep blood (BHIA-S/E). The microorganisms were incubated in anaerobic chamber with an atmosphere of 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂ at 37°C for 72 hours. For quantification of the bacterial culture, serial dilutions were made in brain heart infusion supplemented with 0.5% yeast extract, and 0.1% porcine hemin menadione (BHI-S). An aliquot of 0.1 ml of each dilution was grown on BHIA-S/E to determine the colony forming units (CFU)/ml culture grown in BHI-S after 48 hours of incubation in anaerobiosis.

Stimulation of peripheral blood mononuclear cells with HA and *P. gingivalis*

To verify the effect of HHA and LHA on the phenotypic and functional characteristics of monocytes, 2x10⁵ PBMC per well of plate bottom 96-well "U" were incubated with HHA or LHA in final concentration of 0.2%, for 16 hours at 37°C, 5% CO₂.

Aiming to evaluate the effect of microbial stimulation observed in sites of periodontal disease, PBMC were preincubated with *P. gingivalis* in proportion MOI (multiplicity of infection) of 100: 1, for 1 hour at 37°C, 5% CO₂. Then HHA or LHA were added in 0.2% final concentration and the cells incubated for a further 16 hours. The HA concentration and the ratio of *P. gingivalis* MOI were determined previously by our researcher group.

The following experimental groups of PBMC were obtained: control (RPMI), LHA (low molecular weight hyaluronic acid 0.2%), HHA (high molecular weight hyaluronic acid 0.2 %), Pg (*P. gingivalis*), Pg-LHA (*P. gingivalis* + low molecular weight hyaluronic acid 0.2%) and Pg-HHA (*P. gingivalis* + high molecular weight hyaluronic acid 0.2%).

Immunofluorescence and flow cytometry

The protocol for immunofluorescence reactions and flow cytometry was based on that described by Souza et al.⁴², with some modifications. Cells were first incubated for 15 minutes at 4°C with anti-CD14 antibodies (ef450 Clone 61D3, eBioscience) and CD16 (APCCy7, Clone 3G8, BioLegend) diluted in 0.015 M PBS, pH 7.4 containing 0, 01% azide and 0.2% bovine serum albumin (BSA). Cells were washed with PBS and fixed with 2% formaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature. Then, for intracytoplasmic labeling, cells were permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) and incubated with monoclonal anti-IL-1β (FITC, clone

JK1B-1, BioLegend), IL-6 (APC Clone MQ2-13A5, BioLegend), IL-10 (PE, clone JES3-19F1, BioLegend), IL-12 (PE, clone C11.5, BioLegend), TNF- α (ALX700 Clone MAb11, eBioscience) for 30 minutes at room temperature. After washing with PBS, cells were analyzed in LSRFortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson, NJ, USA).

Cytometry analyses were performed using the FlowJo X software (Tree Star Inc., USA). CD14⁺ monocyte populations were selected in graphics granularity versus CD14. Within this population there was selected the subpopulations of intermediate monocytes (CD14⁺CD16⁺) and classical monocytes (CD14⁺CD16⁻), based on CD16 expression. The frequency of positive cells assessed for each cytokine, and the median intensity of fluorescence (MIF) of each marker were determined within the total population of CD14⁺ monocytes and monocytic within each subpopulation selected.

Statistical analysis

The normality test Kolmogorov-Smirnov showed normal distribution of data. To verify the existence of differences between the various treatments on the expression of cytokines one-way ANOVA test was used followed by the post hoc Tukey test to compare pairs with 5% significance level. The analysis were performed using the software GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

Incubation of PBMC with HHA or LHA did not significantly alter the frequency of CD14⁺ monocytes producing IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 or IL-12 not even the median intensity of fluorescence of these cytokines (Figure 1). However, the HHA group showed significantly higher frequencies of CD14⁺ monocytes producing IL-1 β compared to the LHA group (Figure 1A).

Stimulation with *P. gingivalis* significantly increased the frequencies of CD14⁺ monocytes producing IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 or IL-12 producers as well as the medians intensity of fluorescence of IL-1 β , IL 6, and TNF- α (Figure 1). Adding HHA or LHA did not significantly change the production of cytokines evaluated in CD14⁺ monocytes stimulated with *P. gingivalis*.

Considering the subpopulation of CD14⁺CD16⁻ monocytes, addition of HHA or LHA not significantly alter the frequency of cells producing cytokines evaluated, or the intensities of IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression (Figure 2). However, the HHA

group showed significantly higher frequencies of CD14⁺CD16⁻ monocytes producing IL-1 β and TNF- α when compared to the LHA group (Figure 2A and 2E). Stimulation with *P. gingivalis* significantly increased frequency of cells producing IL-1 β , TNF- α , IL-10 or IL-12 as well as the median intensity of fluorescence of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in this monocyte subpopulation (Figure 2). Addition of HHA or LHA to *P. gingivalis* stimulated cells also did not significantly alter the frequencies of positive cells or the expression intensities of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in CD14⁺CD16⁻ monocyte subpopulation (Figure 2).

Analysis of CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation showed that HHA or LHA not altered significantly the frequency of cells producing the evaluated cytokines, or the intensities of the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Figure 3). Although stimulation with *P. gingivalis* has significantly increased frequency of cells producing IL-1 β , TNF- α , IL-10 or IL-12 and the median intensity of fluorescence of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , unlike the classical monocyte subpopulation of the bacteria was not able to increase the frequency of IL-6⁺ in intermediate subpopulation of monocytes (Figure 3). There were no significant differences in the frequencies of CD14⁺CD16⁺ monocytes producing cytokines and in the expression intensities of them between the group Pg and Pg-HHA or Pg-LHA groups (Figure 3). However, the addition of HHA or LHA to *P. gingivalis* stimulated cells was able to reduce the frequencies and the intensity of expression of IL-1 β in CD14⁺CD16⁺ monocytes at similar levels to those found in the control group (Figure 3A and 3B).

DISCUSSION

In periodontal disease, the initial response to the aggression consists of a nonspecific inflammatory reaction with activation of the innate immune system. Amplification of this response results in the production and activation of cytokines and other mediators, which enhances the inflammatory response and raises the acquired immune response.²³

IL-12 produced by macrophages, monocytes and dendritic cells in response to bacterial products acts stimulating the differentiation of naive T lymphocytes to the Th1 subtype, which are determinants in strength and combatting intracellular microorganisms.^{38,47} Inflammatory cells such as CD4⁺ T lymphocytes (helper) and CD8 (cytotoxic) are of great importance in the pathogenesis of periodontal disease, as they influence the profile produced across cytokines to an injury by an infectious

agent which undergo the direct influence of the pathogen nature, dose of this antigen and host genetic factors.²⁰ These cytokines associated with specific transcription factors will determine the type of acquired response effector (Th1, Th2 or Th17 cells) or suppressor (regulatory T cells).¹²

The activation of macrophages present in the tissues through the recognition of microbial products, leads to secretion of cytokines and other inflammatory mediators that are responsible for vascular and cellular phenomena.^{17,29,46} In places where there is bacterial infection, products such as lipopolysaccharide (LPS) activate macrophages stimulating the phagocytic and microbicide ability, through the generation of reactive oxygen intermediates.^{9,14} The proportions of cytokines produced by inflammatory cells determine the biological effects at the sites of infection, such as combating organisms and antigens and tissue destruction.^{9,14}

In this study, the population of CD14⁺ monocytes HHA group had a higher frequency of cells producing IL-1 β than LHA group. A similar result was observed within the group of classical monocytes (CD14⁺CD16⁻). However, in this monocytic subpopulation, the HHA group also showed higher frequency of TNF- α positive cells when compared to the LHA group. No significant differences were observed in the IL-10 expression. These data suggest a greater proinflammatory effect of high molecular weight HA compared to low molecular weight HA in circulating monocytes. Different results were found in studies that showed proinflammatory effect of low molecular weight HA with stimulation of the expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human fibrocytes and chondrocytes of mice, while a high molecular weight HA had the opposite effect.³² Smaller HA fragments of tetra and hexasaccharides increase the production of IL-1, TNF- α and IL-12 by dendritic cells as well as their antigen presentation capacity.²⁵ This divergence between our findings and those found in the literature can be justified by the difference between the models of study and evaluated cell types that may exhibit different behaviors interfering in the results. It was also demonstrated in another study that both high and low molecular weight HA were able to stimulate metalloproteinase expression of matrix-9 (MMP-9), IL-1, IL-8 and TNF- α by blood monocytes from the umbilical cord.³⁵

IL-1, IL-6 and TNF- α are important mediators of inflammation by inducing changes in vascular endothelium, stimulate leukocyte recruitment and effector mechanisms of cellular immunity.⁴⁰ These cytokines are produced by macrophages

and stimulates osteoclastogenesis and subsequent bone resorption.^{3,5} TNF- α and IL-1 also have capacity to inhibit collagen synthesis.^{21,27} TNF- α acts in the cell migration process by inducing regulation of adhesion molecules and stimulation of production of chemokines, which are chemotactic cytokines involved in cell migration to sites of inflammation.^{14,28,36,45} In inflamed periodontal sites, TNF- α is found in high levels in both the gingival crevicular fluid and the periodontal tissues, being associated with the expression of MMPs and ligand receptor activator of nuclear factor kB (RANKL), molecules involved in osteoclastogenesis and bone resorption.^{18,19} Our results showed that incubation of PBMC with HHA or LHA did not significantly alter the frequencies of classical (CD14⁺CD16⁻) or intermediate monocytes (CD14⁺ CD16⁺). However, the HHA group showed significantly higher frequencies of classical monocytes producing IL-1 β and TNF- α when compared to the LHA group, suggesting that different subpopulations of monocytes exhibit different behaviors as cytokine release in the presence of hyaluronic acid.

Several studies have shown the use of HA in inflamed periodontal sites with beneficial results on clinical parameters.^{7,15,16} Considering that AH are able to bind to cell surface molecules whose activate intracellular signaling pathways²⁵, one of the possible effects of HA in the improved clinical parameters.¹⁵ could be in modulating expression of cytokines by immunocompetent cells activated by microbial products of subgingival plaque.

Considering that cells in inflamed periodontal tissues are stimulated by bacterial products, were previously stimulated human monocytes with *P. gingivalis* and then incubated with high or low molecular weight HA. Stimulation with *P. gingivalis* significantly increased the frequency of monocytes producing all tested cytokines, except the IL-6 in the intermediate monocyte subpopulation, reinforcing the idea that different subpopulations of monocytes respond differently to the microbial stimulus.

In the present study, although incubation with HA did not significantly affected the expression of cytokines in the intermediate monocyte subpopulation, adding HHA or LHA to cells stimulated with *P. gingivalis* prevented the increase in the frequency of IL-1 β ⁺ cells and the intensity of the expression of this cytokine. IL-1 β exerts potent inducing activity of bone resorption and secretion of matrix metalloproteinases (MMPs), responsible for the destruction of periodontal tissues in periodontal disease.⁶ It was observed that local IL-1 levels decrease significantly after the

completion of the treatment of periodontal disease.²² Intermediate monocytes express higher levels of adhesion molecules,¹ suggesting increased recruitment of this subpopulation to sites of periodontal disease. Thus, the reduction in the expression of IL-1 β induced by HHA or LHA in the intermediate monocyte subpopulation suggests modulatory effects of inflammation, with reduction of tissue damage in periodontal sites infected with *P. gingivalis*.

Differently of destructive pathway involving pro-inflammatory cytokines, regulatory pathways mediated by anti-inflammatory cytokines can control or reduce the development of inflammation. In periodontal disease, there was high levels of IL-10, which may be related to an attempt to control immunoinflammatory mechanisms with decreased disease severity.^{18,30} The IL-10 directly affects the production of interferon gamma (IFN- γ) by T lymphocytes, playing an important role as immunoregulatory cytokine.^{26,34} Moreover, IL-10 reduces IFN- γ and TNF- α expression in NK cells and the expression of various proinflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α in macrophages.^{10,11} The results of the present study showed that incubation with HHA and LHA was unable to significantly affect the expression of IL-10 by monocytes stimulated with *P. gingivalis*, suggesting that HA action is not by direct induction of anti-inflammatory cytokines expression in periodontal sites.

Studies suggest that inflammatory action of high molecular weight HA molecules is due in part by the inhibition of diffusion of inflammatory mediators such as prostaglandins, metalloproteinases and other bio-active molecules present in the extracellular matrix, making the cellular communication.³¹ penetration of bacteria and bacteria-cell interactions difficult.⁴ Furthermore, it has been demonstrated antimicrobial effect of HA for *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia*.^{37,39}

Although this study has shown the ability of high and low molecular weight HA to prevent the increase of IL-1 β expression induced by *P. gingivalis* in intermediate monocytes, the antiinflammatory effect of HA in sites with periodontal disease appears to involve other mechanisms non-dependent modulation of the direct action of cytokines in immunocompetent cells stimulated by periodontopathogen.

REFERENCES

1. Antonelli LR, Leoratti FM, Costa PA, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog*. 2014 Sep 18;10(9):e1004393.
2. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998 Jan 1;160(1):403-9.
3. Athanasou NA. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg*. 1996;78-A(7):1096-112.
4. Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res*. 2010 Oct-Dec;21(4):575-8.
5. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 1986 Feb;319(6053):516-8.
6. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993 Nov;28(6 Pt 2):500-10.
7. 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 Int*. 2013 Mar;44(3):231-40.
8. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Prestipino V, Scuruchi M, Nastasi G, et al. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. *Biofactors*. 2012 Jan-Feb;38(1):69-76.
9. Cannon JG. Inflammatory cytokines in nonpathological states. *News Physiol Sci*. 2000 Dec;15:298-303.
10. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1108-11.
11. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008;180(9):5771-7.
12. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*, 2013;2013:503754.

13. 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 Apr;10(4):1558-70.
14. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(3):483-6, 2000.
15. Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul SI, Jentsch H. Hyaluronic Acid as an adjunct after scaling and root planning: a prospective randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2013 Jul;84(7):941-9.
16. 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 Aug;16(4):1229-36.
17. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Jun;4(3):281-6.
18. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W Jr, Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res.* 2006 Dec;41(6):580-4.
19. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91.
20. Hajishengalis G, Sahingur SE. Novel inflammatory pathways in periodontitis. *Adv Dent Res.* 2014;26(1):23-9.
21. Harrison JR, Kleinert LM, Kelly PL, Krebsbach PH, Woody C, Clark S, et al. Interleukin-1 represses COL1A1 promoter activity in calvarial bones of transgenic ColCAT mice in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998 Jul;13(7):1076-83.
22. Howells GL. Cytokine networks in destructive periodontal disease. *Oral Dis.* 1995;1(4):266-70.
23. Hwang AM, Stoupel J, Celenti R, Demmer RT, Papapanou PN. Serum antibody responses to periodontal microbiota in chronic and aggressive periodontitis: a postulate revisited. *J Periodontol.* 2014 Apr;85(4):592-600.
24. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Göcke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol.* 2003 Feb;30(2):159-64.
25. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:435-61.
26. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines,

- IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3513-21.
27. Kacena MA, Gundberg CM, Nelson T, Horowitz MC. Loss of the transcription factor p45 NF-E2 results in a developmental arrest of megakaryocyte differentiation and the onset of high bone mass phenotype. *Bone.* 2005 Feb;36(2):215-23.
 28. Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes tha develop with RANKL into functional osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2006 Feb;21(2):193-206.
 29. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine enviromment. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Sep;9(9):703-18.
 30. Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflamattory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol.* 2001 Feb;123(2):294-300.
 31. Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis.* 1995 May; 54(5): 429–432.
 32. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially regulate human fibrocyte differentiation. *PLos One.* 2011;6(10):260-78.
 33. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. Prophyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068.
 34. Naundorf S, Schröder M, Höflich C, Suman N, Volk HD, Grütz G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol.* 2009 Apr;39(4):1066-77.
 35. Osterholt HC, Lundeland B, Sonerud T, Saugstad OD, Nakstad B. The impact of Hyaluronan on monocyte Toll-like receptor expression in term infant cord blood. *Acta Paediatr.* 2012 Jul;101(7):706-13.
 36. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, et al. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 an p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):943-52.

37. Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Piloni A, Bernard GW. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):370-4.
38. Queiroz-Junior CM, Silva MJ, Corrêa JD, Madeira MF, Garlet TP, Garlet GP, et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:327417.
39. Rodrigues SV, Acharya AB, Bhadbhade S, Thakur SL. Hyaluronan-containing mouthwash as an adjunctive plaque-control agent. *Oral Health Prev Dent*. 2010;8(4):389-94.
40. Romagnani S. Citokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol*. 2002 May;38(12-13):881-5.
41. Sadowitz B, Seymour K, Gahtan V, Maier KG. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *J Surg Res*. 2012 Apr;173(2):e63-72.
42. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, 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. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1886-94.
43. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Apr;12(2):79-87.
44. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol*. 1993 May;64(5 Suppl):450-5.
45. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):45-65.
46. Wells CA, Ravasi T, Hume DA. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leukoc Biol*. 2005 Jul;78(1):9-13.
47. Yun PL, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. 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. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5650-60.
48. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80.

FIGURES

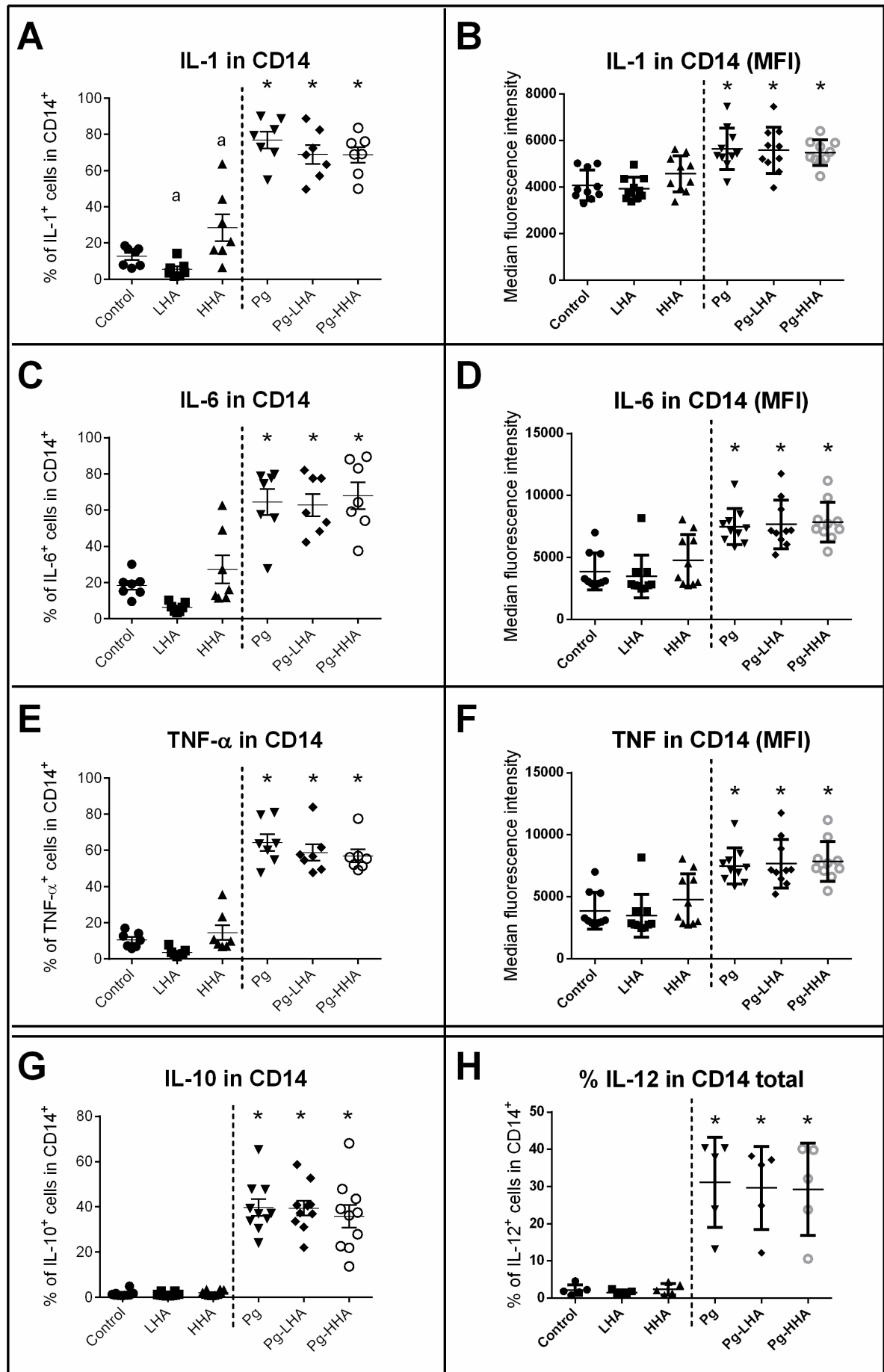


Figure 1 - Percentage of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD14+ monocyte population.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

a Lowercase letter represent significant differences between different treatments with cells not stimulated with *P. gingivalis* or between cells stimulated with *P. gingivalis*. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

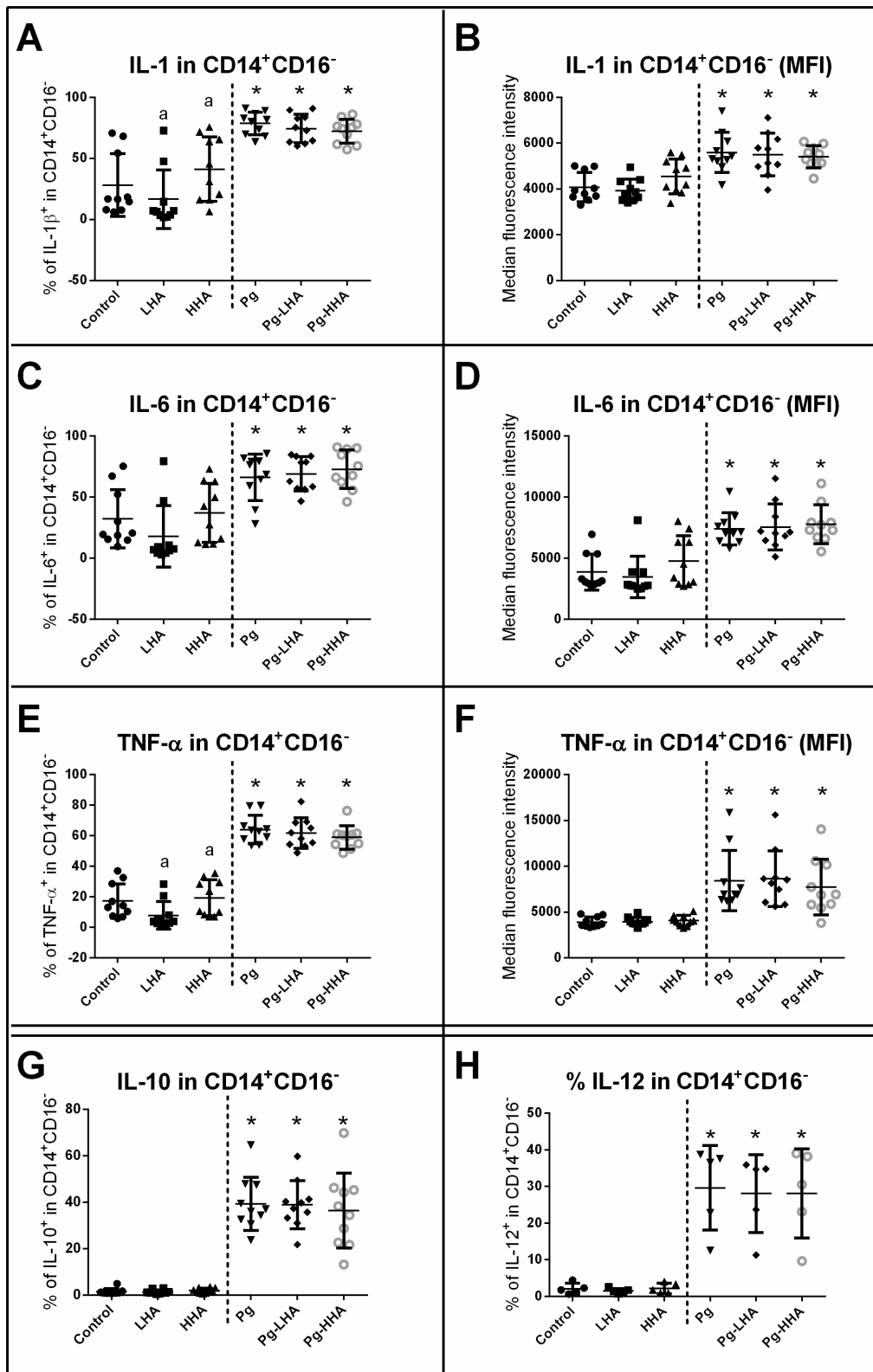


Figure 2 - Percentage of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD14⁺CD16⁻ monocyte subpopulation.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

a Lowercase letter represent significant differences between different treatments with cells not stimulated with *P. gingivalis* or between cells stimulated with *P. gingivalis*. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

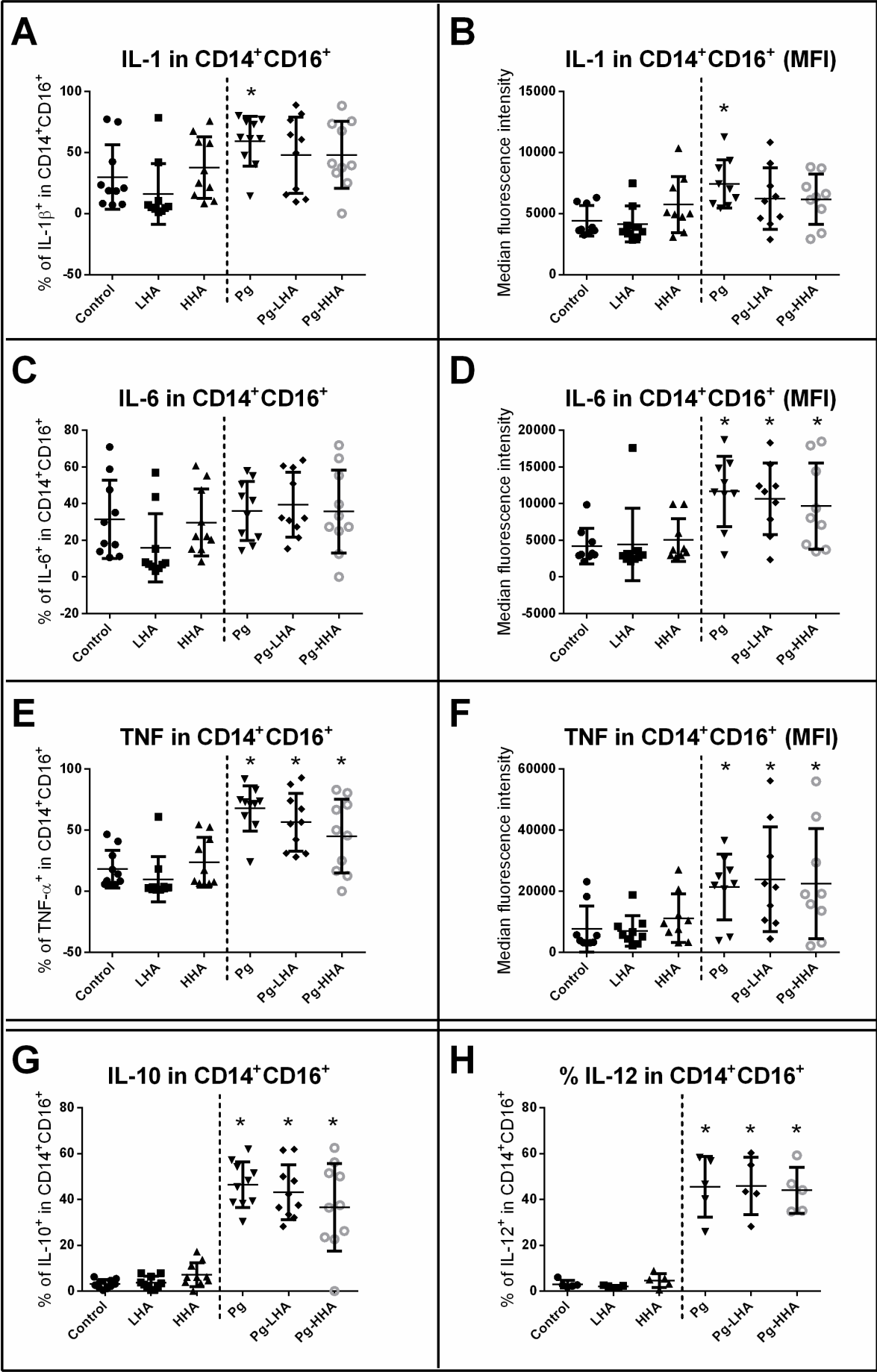


Figure 3 - Percentage of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation.

* Indicates significant difference compared to control group. One-way ANOVA with repeated measures test followed by Tukey post hoc test at 5% significance level.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o AH seja capaz de se ligar aos monócitos, nossos dados sugerem que o efeito clínico anti-inflamatório observado em estudos prévios, não envolve inibição da expressão de moléculas de superfície e citocinas pró-inflamatórias. Estudos adicionais envolvendo sua atividade microbicida e também análises in vitro com outros periodontopatógenos envolvidos na doença periodontal são necessários.

REFERÊNCIAS

- ANTONELLI, L.R. et al. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Pathogens**, v.10, n.9, e1004393, 2014.
- ALLEY, C.S. et al. HLA-D and T lymphocyte reactivity to specific periodontal pathogens in type 1 diabetic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.64, n.10, p. 974-979, Oct. 1993.
- 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, Sept./Oct. 2004.
- ARA, T. et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.44, n.1, p. 21-27, Feb. 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, n.3, p. 209-220, Jan. 2006.
- ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Immunology**, v.160, p. 403-409, 1998.
- 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.
- BALLINI, A. et al. Esterified hyaluronic acid and autologous bone in the surgical correction of the infra-bone defects. **International Journal of Medical Sciences**, v.6, n.2, p. 65-71, 2009.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, L.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, n.6673, p. 245-252, 1998.
- BANSAL, J.; KEDIGE, S.D.; ANAND, S. Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. **Indian Journal Dental Research**, v.21, n.4, p. 575-578, 2010.
- BECK-SHIMMER B. et al. Hyaluronan induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tubular epithelial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.9, p. 2283-2290, 1998.
- BERTOLINI, D.R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Reviews Nature**, v.319, p. 516-518, 1986.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **Journal of Periodontal Research**, v.6, n.2, p. 500-510, 1993.
- 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, 2001.

- BOYLAN, M.T. et al. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) expression in multiple sclerosis patients: clinical subtype specific variation in peripheral monocytes and B cells and lack of modulation by high dose methylprednisolone. **Journal of the Neurological Sciences**, v.167, n.2, p. 79-89, 1999.
- BRIGUGLIO, F. et al. Treatment of infrabony periodontal defects using a resorbable biopolymer of hyaluronic acid: a randomized clinical trial. **Quintessence International**, v.44, n.3, p. 2031-2040, 2013.
- CAMPO, G.M., et al. Hyaluronan differently modulates TLR4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. **Biofactors**, v. 38, n.1, p. 69-76, 2012.
- CANDEL-MARTÍ, M.E. et al. Dental implants in patients with oral mucosal alterations: An update. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.16, n.6, p. 787-793, 2011.
- CANNON, J.G. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. **News in Physiological Sciences**, v.15, p. 298-303, Dec. 2000.
- CARRICHES, C.L.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.M.; RODRIGUEZ, 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.
- CHIMMA, P. et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **PLoS Pathogens**, v.5, n.10, e1000631, 2009.
- 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. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.121, n.5, 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, n.9, p. 5771-5777, 2008.
- CROS, J. et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v.33, n.3, p. 375-386, 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, Sept. 2004.
- DAVIDSON, D.C. et al. Excess Soluble CD40L contributes to blood brain barrier permeability in vivo: implications for HIV-associated neurocognitive disorders. **PLoS One**, v.7, n.12, p. e51793, 2012.
- DEED, R. et al. Early-response gene signaling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. **International Journal of Cancer**, v.71, n.2, p. 251-256, 1997.

DEGRENDELE, H.C. et al. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, n.3, p. 1119-1130, 1996.

DI BENEDETTO, A. et al. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2013, Article ID 503754, 2013.

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

DINARELLO, C.A. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. **European Cytokine Network**, v.11, n.3, p. 483-486, Sept. 2000.

EICK, S. et al. Hyaluronic Acid as an adjunct after scaling and root planning: a prospective randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, v.84, n.7, p. 941-949, 2013.

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. **The Journal of Experimental Medicine**, v.190, n.1, p. 9-19, 1999.

FAWZY EL-SAYED, K.M. et al. Local application of Hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. **Clinical Oral Investigation**, v.16, n.4, 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.

FIEBER, C. et al. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases, **Journal of Cell Science**, v.117, p. 359-367, 2004.

FIELDS, P.E. et al. B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naïve CD8⁺ TCR-transgenic T cells. **Journal of Immunology**, v.161, n.10, p. 5268-5275, 1998.

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

GARLET, G.P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal Dental Research**, v.89, n.12, p. 1349-63, 2010.

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, n.6, p. 580-584, 2006.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v.19, n.1, p. 71-82, 2003.

GEMMELL, E. et al. P. gingivalis-specific T-cell lines produce Th1 and Th2 cytokines. **Journal Dental Research**, v.81, n.5, p. 303-307, 2002.

GLOWACKA, E. 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.2, p. 254-260, 2010.

GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.74, n.3, p. 391-401, 2003.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.79, n.8, p. 1585-1591, 2008.

GREWAL, I.S.; XU, J.; FLAVELL, R.A. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. **Nature**, v.378, n.6557, p. 617-620, Dec. 1995.

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, n.7, p. 1076-1083, 1998.

HAJISHENGALLIS, G. et al. Porphyromonas gingivalis Fimbriae Proactively Modulate beta-2 Integrin Adhesive Activity and Promote Binding to and Internalization by Macrophages., **Infection and Immunity**, v.74, n.10, p. 5658-5666, 2006.

HAJISHENGALLIS, G.; WANG, M.; LIANG, S. Induction of distinct TLR2 mediated proinflammatory and proadhesive signaling pathways in response to porphyromonas gingivalis fimbriae. **Journal of Immunology**, v.182, n.11, p. 6690-6696, 2009.

HAROKOPAKIS, E.; HAJISHENGALLIS, G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. **European Journal of Immunology**, v.35, n.4, p. 1201-1210, Apr. 2005.

HOLLENBAUGH, D. et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene Family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. **The EMBO Journal**, v.11, n.12, p. 4313-4321, Dec. 1992.

HORTON, M.R., et al. Regulation of Hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages. **Journal of Immunology**, v.160, n.60, p. 3023-3030, 1998.

HOWELLS, G.L. Cytokine networks in destructive periodontal disease. **Oral Diseases**, v.1, n.4, p. 266-270, 1995.

HUEBER, A.J. et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. **Journal of Immunology**, v.184, n.7, p. 3336-3340, 2010.

HUNT, D.R. et al. Hyaluronan supports recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone reconstruction of advanced alveolar ridge defects in dogs. A pilot study. **Journal of Periodontology**, v.72, n.5, p. 651-658, 2001.

INABA, K. et al. Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.378, p. 65-70, 1995.

JENTSCH, H. et al. Treatment of gingivitis with Hyaluronan. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, n.2, p. 159-164, 2003.

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.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.76, n.5, 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, n.7, p. 3513-3521, 1998.

KACENA, M.A. et al. Loss of the transcription factor p45 NF-E2 results in a developmental arrest of megakaryocyte differentiation and the onset of high bone mass phenotype. **Bone**, v.36, n.2, p. 215-223, 2005.

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 the develop with RANKL into functional osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.21, n.2, p. 193-206, 2006.

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 non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. **Journal of Oral Science**, v.41, n.4, p. 163-167, 1999.

KWAKKENBOS, M.J. et al. The human EGF-TM7 family member EMR2 is a heterodimeric receptor expressed on myeloid cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.71, p. 854-862, 2002.

LANG, T.J. et al. In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function. **Journal of Immunology**, v.168, n.8, p. 3786-3792, 2002.

LAPPIN, D.F. et al. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. **Clinical and Experimental Immunology**, v.123, n.2, p. 294-300, 2001.

LAURENT, T.C.; LAURENT, U.B.G.; FRASER, J.R.E. Functions of Hyaluronan. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.54, p. 429-432, 1995.

LE-BARILLEC, K. et al. Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. **Journal of Immunology**, v.175, n.3, p. 1735-1740, 2005.

- LENSCHOW, D.J. et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.23, p. 11054-11058, 1993.
- LESLEY, J.; HYMAN, R.; KINCADE, P.W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. **Advances in Immunology**, v.54, p. 271-335, 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.
- LUKE, H.J.; PREHM, P. Synthesis and shedding of Hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells. **Biochemical Journal** v.343, n.1, p. 71-75, 1999.
- 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.
- 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, p. 260-278, 2011.
- MARCACCINI, A.M. et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. **Clinica Chimica Acta**, v.409, n.1-2, p. 117-122, 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, n.1, 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.
- MCKEE, C.M. et al. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. **Journal of Clinical Investigation**, v.98, n.10, p. 2403-2413, 1996.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY JÚNIOR, C.A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v.296, n.5566, p. 298-300, Apr. 2002.
- MENDES, R.M. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. **Archives of Oral Biology**, v.53, n.12, p. 1155-1162, 2008.
- MESA, F.L. et al. Antiproliferative effect of topic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. **Histology and Histopathology**, v.17, p. 747-753, 2002.
- MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. **Trends in Microbiology**, v.12, n.4, p. 186-192, 2004.

MOHAMED, A.; ELHEL, U. The role of macrophages in immunology. **Journal of the National Medical Association**, v.75, n.3, p. 314-317, 1983.

MOHARAMZADEH, K.; BROOK, I.M.; VAN NOORT, R. Biocompatibility of Resin- based Dental materials. **Journal of Materials**, v.2, p. 514-548, 2009.

MUMMERT, M.E. et al. Development of a peptide inhibitor of Hyaluronan-mediated leukocyte trafficking. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, p. 769-779, 2000.

MYSAK, J. et al. *Prophyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. **Journal of Immunology Research**, v.2014, p. 4760-4768, 2014.

NANDI, A.; ESTESS, P.; SIEGELMAN, M.H. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.20, p. 14939-14948, 2000.

NAUNDORF, S. et al. IL-1- interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. **European Journal of Immunology**, v.39, n.4, p. 1066-1077, 2009.

OERTLI, B. et al. Mechanisms of Hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: Hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor -kB and activating protein-1. **Journal of Immunology**, v.161, n.7, p. 3431-3437, Oct. 1998.

OLSSON, C. Biased dependency of 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.

ORIMA, K. et al. Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. **Clinical & Experimental Immunology**, v.115, n.1, p. 153-160, 1999.

OSTERHOLT, H.C. et al. The impact of Hyaluronan on monocyte Toll-like receptor expression in term infant cord blood. **Acta Paediatrica**, v.101, n.7, p. 706-713, 2012.

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

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. **Blood**, v.74, p. 2527-2534, 1989.

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**, v.2, n.3-4, p. 3-9, 2011.

PIRNAZAR, P. et al. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. **Journal of Periodontology**, v.70, n.4, 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. **Cell Biochemistry and Function**, v.12, n.4, p. 281-288, Dec. 1994.
- QUEIROZ-JUNIOR, C.M. et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. **Clinical & Developmental Immunology**, v.2010, p. 327-417, 2010.
- RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H. Immune responses to intracellular bacteria. **Current Opinion in Immunology**, v.13, n.4, p. 417-428, Aug. 2001.
- RAKICH, D.R. et al. Effect on dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. **Journal of Endodontics**, v.25, n.2, p. 114-117, Feb. 1999.
- RODRIGUES, S.V. et al. Hyaluronan-containing mouthwash as an adjunctive plaque-control agent. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v.8, n.4, p. 389-394, 2010.
- ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v.38, n.12-13, p. 881-885, 2002.
- 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, Mar. 1984.
- SADOWITZ, B. et al. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia. **Journal of Surgical Research**, v.173, n.2, 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.
- SERBINA, N.V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annual Review of Immunology**, v.26, p. 421-452, 2008.
- SIEGELMAN, M.H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasion uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, n.5, p. 683-691, Mar. 2000.
- SILVA, E.C. et al. Hyaluronic acid on collagen membranes: Na experimental study in rats. **Archives of Oral Biology**, v.73, p. 214-222, 2017.
- SLEVIN, M. et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. **Matrix Biology**, v.26, n.1, p. 58-68, Jan. 2007.
- TERMEER, C.C. et al. Oligosaccharides of Hyaluronan are potent activators of dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.165, p. 1863-1870, 2000.

THOMAS, M.V.; PULEO, D.A. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. **Journal of Dental Research**, v.90, n.9, p. 1052-1061, Sept. 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, n.1, p. 148-152, Feb. 2010.

TOOLE, B.P. Hyaluronan in morphogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.12, n.2, p. 79-87, 2012.

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

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

VAN DER MERWE, P.A. et al. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a 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, 2004.

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-kappaB (NF-kappaB) pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.32, p. 24639-24645, Aug. 2010.

WAHL, S.M. et al. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. **Journal of Periodontology**, v.64, n.5, p. 407-415, 1993.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death and Differentiation**, v.10, n.1, p. 45-65, Jan. 2003.

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, n.6, p. 928-936, 2007.

YOSHIMURA, A. et al. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v.15, n.6, p. 704-708, Dec. 2003.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. **Nature Reviews. Immunology**, v.7, n.6, p. 454-465, June 2007.

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, p. e7, Aug. 2013.

YUN, P.L. 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. 5650-560, 2001.

ZHAO, Z.Z. et al. Promotion of immunity of mice to Pasteurella multocida and hog cholera vaccine by pig interleukin-6 gene and CpG motifs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.32, n.3, p. 191-205, May 2009.

ZAWADA, A.M. et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. **Blood**, v.118, n.12, p. 50-61, 2011.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, p. 584-592, 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v.116, n.16, p. 74-80, 2010.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.; PASSLICK, B.; FLIEGER, D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. **Hybridoma**, v.7, p. 521-527, 1988.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular na atividade de leucócitos humanos estimulados por periodontopatógenos

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54227916.0.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.501.513

Apresentação do Projeto:

O ácido hialurônico (AH) é um importante componente da matriz extracelular que tem sido estudado há alguns anos. Sua forma sintética é amplamente utilizada nas áreas biomédicas. Vários estudos mostraram que o AH interfere em processos biológicos como inflamação, angiogênese, diferenciação celular e reparo tecidual. Esses efeitos dependem do peso molecular do AH, pois moléculas de baixo peso parecem estimular a angiogênese, enquanto as de alto peso estimulam processos de reparo tecidual. Por meio de punção de veia periférica (feita por enfermeira, no laboratório de Patologia da PUC), serão coletados 20mL de sangue de 20 doadores voluntários saudáveis em tubos contendo heparina para isolamento de células mononucleares de sangue periférico (monócitos e linfócitos). Para verificar o efeito do AH, as células serão incubadas por 20 horas, em estufa de CO₂.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do AH de alto e de baixo peso moleculares na atividade de leucócitos estimulados *in vitro* por *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A coleta de sangue será feita por pesquisador com experiência nesse procedimento,

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228

Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3319-4517

Fax: (31)3319-4517

E-mail: cep.propg@pucminas.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG**



Continuação do Parecer: 1.501.513

utilizando tubos a vácuo e material descartável. O procedimento pode causar pequeno desconforto durante a coleta e é possível que ocorra um hematoma na área, o que é minimizado por meio de compressão com dedo no local.

Benefícios:

Os resultados poderão permitir melhor conhecimento sobre os mecanismos moleculares e celulares pelos quais o AH pode interferir nos processos imunoinflamatórios, gerando os efeitos clínicos observados no tratamento das doenças periodontais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_680237.pdf	16/03/2016 09:42:36		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAH.docx	16/03/2016 09:42:16	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLAcidohialuronico.doc	16/03/2016 09:40:57	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Acelto
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAH.pdf	16/03/2016 09:40:40	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
 Bairro: Coração Eucarístico CEP: 30.535-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3319-4517 Fax: (31)3319-4517 E-mail: cep.proppg@pucminas.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



Continuação do Parecer: 1.501.513

BELO HORIZONTE, 15 de Abril de 2016

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico CEP: 30.535-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 Fax: (31)3319-4517 E-mail: cep.propg@pucminas.br