

DIONE KAWAMOTO

Efeito da Toxina Distensora Citoletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na atividade Osteoclástica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

**São Paulo
2014**

DIONE KAWAMOTO

Efeito da Toxina Distensora Citoletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na atividade Osteoclástica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan como parte das exigências para a Obtenção de título de Doutor.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

Versão original

**São Paulo
2014**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Kawamoto, Dione.

Efeito da toxina distensora citletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na atividade osteoclástica / Dione Kawamoto.
-- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Efeito da toxina citoletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Versão do título para o inglês: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin effect in osteoclastic activity.

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 2. Toxina distensora citoletal 3. Celulas RAW 264.7 4. Celulas de medula ossea murinic 5. Osteoclastos 6. I. Mayer, Profa. Dra. Marcia Pinto Alves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB037/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Dione Kawamoto.

Título da Tese: Efeito da toxina distensora citletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na atividade osteoclástica.

Orientador(a): Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

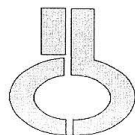
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.023/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 162/09/CEEA, datado de 18.12.09 e por solicitação da Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Dione Kawamoto** ao Projeto de Pesquisa "*Efeito da toxina distensora citoletal de aggregatibacter actinomycetemcomitans sobre a modulação do sistema imune*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 04 de maio de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

Agradecimentos

À minha orientadora Prof. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer por sua sábia orientação, conselhos, incentivos, compreensão, paciência e amizade que permitiram a finalização desse trabalho.

Ao João Paulo Ribeiro, Leo Cruz Batista, funcionários do Laboratório de Microbiologia oral, pelo auxílio no laboratório que sempre estavam dispostos e me ajudar.

Sr. Carlos Augusto da Silva, por sempre me ajudar no Biotério.

Marco Aurélio, Fábria, Eliane e Arthur pela atenção e dedicação nas fases administrativas.

Prof. Niels Olsen Saraiva Camara, Prof. Beny Spira e Prof Luis Carlos de Souza Ferreira por disponibilizarem seus laboratórios para a utilização de equipamentos.

À Andrea Cecilia Dorión Rodas e Meire Hiyane pela cooperação e atenção.

À Prof. Ana Carolina Magalhães da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, que gentilmente autorizou a utilização do perfilômetro para a análise dos discos de dentina.

Larissa Grizzo que me auxiliou na utilização do perfilômetro.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, laboratório de microbiologia oral do Instituto Biomédicas da Universidade de São Paulo: Ellen Sayuri Ando Suguimoto, Silvia Teixeira Loureiro, Priscila Larcher Longo, Maike Paulino da Silva, Bruno Bueno Silva, Ericka Tavares Pinheiro, Glaucia Santos, Cíntia Sericaku, Pâmela Pontes obrigada pela convivência, cumplicidade, amizade e por compartilharem suas experiências e conhecimentos.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e à Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan

Ao departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, local onde foi desenvolvido todo o trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram de uma maneira direta ou indireta para realização deste trabalho e pelo carinho demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

KAWAMOTO, D. **Efeito da toxina distensora citoletal de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na atividade osteoclástica.** 2014. 88 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans está associado à periodontite agressiva, caracterizada pela intensa reabsorção do osso alveolar. Esta espécie produz a toxina distensora citoletal (AaCDT) que possui atividade de DNase, e promove o bloqueio das células alvo na fase G2 ou G1/ G2. Por outro lado, CDT ativa a cascata apoptótica pela atividade de PIP3, regulando a proliferação e sobrevivência de linfócitos, pelo bloqueio de Akt. Em monócitos, AaCDT induz aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e inibe a produção de óxido nítrico e fagocitose.

Células precursoras de osteoclastos têm origem hematopoiética e sofrem diferenciação em osteoclastos, mediada pelo RANKL, mas outros fatores co-estimulatórios estão envolvidos. A AaCDT induz a produção de RANKL por fibroblastos. Assim, formulamos a hipótese se CDT influenciaria a homeostase óssea por afetar a diferenciação de células precursoras de osteoclastos.

O presente estudo visou determinar o efeito da atividade de AaCDT sobre a sobrevivência, diferenciação e atividade de células precursoras de osteoclastos.

CDT recombinante purificada (Aa(r)CDT) por cromatografia de afinidade foi adicionada a cultura de macrófagos RAW 264.7 ou células de medula óssea de camundongos C57BL/6 (BMC) na presença e na ausência de RANKL. Células sem adição de Aa(r)CDT na ausência ou presença de RANKL e osteoprotegerina foram empregadas como controle. A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT e foram determinados o número de células multinucleadas TRAP + e o perfil de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β por ELISA. A transcrição relativa de genes relacionados à osteoclastogênese *rank*, *ctpk*, *nfatc-1* e *irf-8* foi avaliada por transcrição reversa e PCR quantitativo. A atividade de osteoclastos foi determinada pela avaliação da reabsorção de dentina por perfilometria.

Aa(r)CDT reduziu a viabilidade de macrófagos RAW 264.7, mas não promoveu redução na viabilidade de BMC. A adição de Aa(r)CDT promoveu aumento do número médio de células TRAP+ multinucleadas na ausência de RANKL em células RAW264.7. O número médio de células TRAP+ multinucleadas também foi maior em BMC com adição de Aa(r)CDT, na ausência e presença de RANKL. Aa(r)CDT associada a RANKL induziu a maior produção de IL-6 por células RAW 264.7 e BMC. Além disso, a adição de Aa(r)CDT resultou na diminuição da produção de IL-1 β e IL-10 por BMC, mas não por células RAW264.7. Aa(r)CDT induziu aumento na produção de TNF- α por células RAW 264.7 e BMC. A produção de TGF- β por BMC aumentou com a adição de Aa(r)CDT. A expressão de genes associados a osteoclastogênese em BMC sugere um efeito co-estimulatório de CDT na osteoclastogênese. Não foi detectada reabsorção de dentina nos ensaios realizados.

Os dados sugerem que a CDT interfere na homeostase óssea, favorecendo a indução da diferenciação de células precursoras de osteoclastos e alterando o perfil de citocinas produzidas.

Palavras-chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Toxina distensora citoletal. Células RAW 264.7. Células de medula óssea murínica. Osteoclastos

ABSTRACT

KAWAMOTO, D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin effect in osteoclast activity. 2014. 88 p. Thesis (PhD in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is associated with aggressive periodontitis, characterized by severe alveolar bone resorption. This species produces a distending toxin cytolethal (AaCDT) which has DNase activity, and promotes the blocking of target cells in G2 or G1 / G2 phase. On the other hand, CDT activates the apoptotic cascade by PIP3 activity, regulating lymphocyte proliferation and survival by blocking Akt. In monocytes, AaCDT enhances the production of proinflammatory cytokines and inhibits nitric oxide production and phagocytosis.

Osteoclast precursor cells are of hematopoietic origin and must undergo differentiation into osteoclasts mediated by RANKL although other co-stimulatory factors are involved. AaCDT induces the production of RANKL by fibroblasts. Thus, CDT is hypothesized to influence bone homeostasis by affecting the differentiation of precursor cells into osteoclasts.

This study aimed to determine the effect of AaCDT on survival, differentiation and activity of osteoclasts precursor cells.

Recombinant CDT purified (Aa(r)CDT) by affinity chromatography was added to RAW 264.7 macrophages or bone marrow cells of C57BL/6 mice (BMC) in the presence or absence of RANKL. Cells without addition of Aa(r)CDT in the absence or presence of RANKL and osteoprotegerin were used as controls. Cell viability was determined by MTT assay and the number of multinucleated TRAP + cells was determined and the production of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and TGF- β was investigated by ELISA. The relative transcription of genes related to osteoclastogenesis *rank*, *ctpk*, *NFATc-1* and *IRF-8* was estimated by reverse transcription and quantitative PCR. The activity of osteoclasts was determined by assessing dentin resorption by profilometry.

Aa(r)CDT reduced the viability of RAW 264.7 macrophages, but not induced a reduction in the viability of BMC. The addition of Aa(r)CDT promoted an increase in the average number of multinucleated TRAP + cells in the absence of RANKL in RAW264.7 cells. The average number of multinucleated TRAP + cells was also increased in BMC with the addition of Aa(r)CDT in the absence and presence of RANKL. Aa(r)CDT associated with RANKL led to increased production of IL-6 by RAW 264.7 cells and BMC. Furthermore, the addition of Aa(r)CDT resulted in decreased production of IL-1 β and IL-10 in BMC but not in RAW264.7 cells. Aa(r)CDT induced the production of TNF- α by RAW 264.7 cells and BMC. The production of TGF- β by BMC increased with the addition of Aa(r)CDT. The expression of genes associated with osteoclastogenesis in BMC suggested a co-stimulatory effect on osteoclastogenesis by CDT. There was no detectable resorption in dentin discs.

The data suggested that CDT interfere in bone homeostasis, favoring the differentiation of osteoclasts precursors cells and by altering their cytokines profile.

Keywords: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Cytolethal distending toxin. Células RAW 264.7 cells. Murine bone marrow cells. Osteoclast precursor cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema do periodonto saudável e com periodontite	23
Figura 2 -	Atividade da CDT em células eucarióticas	28
Figura 3 -	Esquema representativo da reabsorção óssea	30
Figura 4 -	Esquema representativo de um osteoclasto	31
Figura 5 -	Discos de dentina preparados para o início do experimento	44
Figura 6 -	Foto do disco de dentina fixado nas placas de acrílico	45
Figura 7 -	Foto do perfilômetro e do posicionamento da placa com o disco de dentina para a análise	46
Figura 8 -	Gráfico da curva de Albumina elaborada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford	47
Figura 9 -	Fotografia de gel de poliacrilamida a 10% corado com Azul de Comassie, onde extratos de proteínas recombinantes rCDTA, rCDTB e rCDTC purificadas foram submetidas à eletroforese	48
Figura 10 -	Fotografia de células CHO após incubação com Aa(r)CDT a células	49
Figura 11 -	Porcentagem de células RAW 264.7 viáveis na presença de diferentes concentrações de Aa(r)CDT	50
Figura 12 -	Viabilidade de células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF e as diferentes concentrações de Aa(r)CDT	50
Figura 13 -	Fotografia representativa de células multinucleadas TRAP + de células RAW 264.7	51
Figura 14 -	Número de células osteoclásticas (TRAP+ e multinucleadas) por poço após a adição de diferentes concentrações de Aa(r)CDT em células RAW 264.7	51
Figura 15 -	Média da contagem de células multinucleadas TRAP + de BMC acrescidas das diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL ...	52
Figura 16 -	Análise da produção de IL-1 β no sobrenadante de células RAW 264.7 após 6 dias de incubação com Aa(r)CDT	52
Figura 17 -	Níveis de IL-1 β produzidas por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de 20 ng/ml de M-CSF e Aa(r)CDT após incubação por 6 dias	53
Figura 18 -	Análise da produção de IL-6 no sobrenadante de células RAW 264.7 e	

	Aa(r)CDT após 6 dias de incubação	53
Figura 19 -	Níveis de IL-6 produzidas por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF e Aa(r)CDT após incubação por 6 dias	54
Figura 20 -	Análise da produção de IL-10 células RAW 264.7 com adição das concentrações de em meio de cultura com adição de Aa(r)CDT após 6 dias de incubação	55
Figura 21 -	Níveis de IL-10 produzidos por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF e Aa(r)CDT após incubação com a adição de Aa(r)CDT por 6 dias	55
Figura 22 -	Análise da produção de TNF- α no sobrenadante de células RAW 264.7 com a adição de M-CSF e Aa(r)CDT após 6 dias de incubação	56
Figura 23 -	Níveis de TNF- α no sobrenadante produzidos por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF e Aa(r)CDT após incubação por 6 dias	56
Figura 24 -	Análise da produção de TGF- β no sobrenadante de células RAW 264.7 com a adição de Aa(r)CDT após 6 dias de incubação	57
Figura 25 -	Níveis de TGF- β no sobrenadante produzidos por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF e Aa(r)CDT após incubação por 6 dias	58
Figura 26 -	Expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese em células RAW 264.7 submetidas a diferentes concentrações de Aa(r)CDT	59
Figura 27 -	Expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese em BMC submetidas a diferentes concentrações de Aa(r)CDT	60
Figura 28 -	Representação gráfica da média aritmética de rugosidade (Ra) obtida das quatro leituras em área controle e área exposta às células RAW 264.7, em ensaio com e sem adição de RANKL, e diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Resultados apresentados para cada disco separadamente.	62
Figura 29 -	Representação gráfica da média da Rmax obtida das quatro leituras em áreas de dentina controle em comparação com as leituras obtidas das áreas expostas às células com as diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL	63

- Figura 30** - Representação gráfica da Ra obtida das quatro leituras em áreas de dentina controle em comparação com as leituras obtidas das áreas expostas às células com as diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL64
- Figura 31** - Representação gráfica da Rmax obtida das quatro leituras em áreas de dentina controle em comparação com as leituras obtidas das áreas expostas às células com as diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Equação de regressão e R-quadrado (R^2) das reações de amplificação de cada gene alvo	58
Tabela 2 -	Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células RAW 264.7 após a inoculação de Aa(r)CDT, em relação à condição controle, sem adição de Aa(r)CDT	59
Tabela 3	Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células RAW 264.7 submetidas a 50 ng/ml RANKL e inoculação de Aa(r)CDT, em relação a condição controle, sem adição de Aa(r)CDT	60
Tabela 4	Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células de medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidas a Aa(r)CDT, em relação a condição controle, sem adição de Aa(r)CDT	61
Tabela 5	Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células de medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidas a 50ng/ml de RANKL e inoculadas com Aa(r)CDT, em relação à condição controle, sem adição de Aa(r)CDT	61

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS

<	Menor
$\Delta\Delta\text{CT}$	Delta delta CT
μg	Micrograma
μm	Micrometro
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Aa(r)CDT	Toxina distensora citoletal recombinante de <i>A. Actinomycetemcomitans</i>
AaCDT	Toxina distensora citoletal de <i>A. Actinomycetemcomitans</i>
AKT	Serina Treonona quinase também conhecida como proteína quinase B (<i>PKB -Protein Kinase B</i>)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise da variância)
AS-BI	Solução de ácido fosfórico naftol
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosina tri fosfato
ATP6v0d2	<i>Atpase, H⁺ transporting, lysosomal 38kda, V0 subunit d2</i>
BMC	<i>Bone marrow cells</i> (células de medula óssea)
BSA	Albumina
CA	Califórnia
CDC	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i> (Cinase dependente de ciclina)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDT	Toxina distensora citoletal
CDTA	Toxina distensora citoletal subunidade A
CDTB	Toxina distensora citoletal subunidade B
CDTC	Toxina distensora citoletal subunidade C
Células CHO	Células de ovário de hamster chinês

Células HeLa	Células epiteliais de carcinoma cervical de Henrietta Lacks
Células KB	Células eucarióticas derivadas de carcinoma epidermóide de cavidade bucal
CFU-M	Colony-forming unit- macrophage/mononuclear (unidade formadora de colônias monocíticas ou monócitos)
Chk2	Proteína serina/treonina quinase
CLC	<i>Cardiotrophin-like cytokine</i> (citocina semelhante a cardiotrofina)
cm	Centímetros
CNTF	Ciliary neutrophilic factor (fator ciliar neutrofílico)
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Threshold cycle (ciclo limitante) - número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i> (cardiotrofina-1)
ctpK	Catepsina K
DAP12	Proteína de massa molecular 12 kda
DC-STAMP	<i>Dendritic cell-specific transmembrane protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (meio eagle modificado por Dulbecco)
DNA-	Ácido desoxirribonucléico
Dnase	desoxirribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleotide <i>triphosphates</i> (desoxirribonucleotídeo trifosfatado)
DO	Densidade óptica
DPEC	Dietilpirocarbonato
Ec-CDT	CDT de <i>Escherichia coli</i>

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i> (quinase regulada por sinal extracelular)
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
g	Gramma
G0	<i>Gap 0</i> (intervalo da divisão celular)
G1	<i>Gap 1-</i> (intervalo da divisão celular)
G2	<i>Gap 2-</i> (intervalo da divisão celular)
<i>gapdh</i>	Gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase
gp 130	Glicoproteína 130
H ⁺ - ATPase	Bombas de prótons
H2Ax	Histona da família H2A
HACEK	Grupo de bactérias Gram-negativas relacionadas com a endocardite composto por <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> e <i>Kingella kingae</i>
HCl	Ácido clorídrico
Hd-CDT	CDT de <i>Haemophilus ducrey</i>
IFN- γ	Interferon gama
IFR-8	<i>Interferon regulator factor-8</i> (fator regulatório de interferon 8)
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranoside
Jak	Janus quinase
JNK	C-Jun NH -terminal quinase

JNKs	<i>C-Jun N-terminal kinases</i> (c-Jun N-terminal quinase)
kDa	Quilodalton
l	Litro
LB	Luria-bertani
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> (fator inibidor de leucemia)
Linfócitos T	Linfócito tímico
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mA	Microampere
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> (proteína ativada por mitógenos)
MAPK	<i>MAP kinase</i> (quinase ativada por mitógenos)
M-CSF	<i>Macrophage-colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônias de macrófagos)
mg	Micrograma
ml	Microlitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MN	Minessota
MNC	<i>Multinucleated cell</i>
Mre11	Meiotic recombination 11
mRNA	RNA mensageiro
MWCO	Molecular weight cut off (separador de peso molecular)
NaCl	Cloreto de sódio
NFATc-1	<i>Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1</i> (fator nuclear c1 ativador de células T)

NF-κB	Nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)
ng	Nanograma
NIH/3T3	Fibroblastos de Camundongos NIH/3T3
NiSO ₄	Sulfato de níquel
NJ	Nova Jérsei
nm	Nanômetro
NPN	(Neuropoietina
NY	New york
°C	Graus celsius
OPD	O-fenilenediamine
OPG	Osteoprotegerina
OSM	Oncostatina M
p	Valor de p
P	Fosfato
p50 ou (NF-κB1)	<i>Nuclear factor κb1</i> (fator nuclear kappa B1)
p52 ou (NF-κB2)	<i>Nuclear factor κb2</i> (fator nuclear kappa B2)
PAg	Periodontite agressiva generalizada
PAI	Periodontite agressiva localizada
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina fosfatada
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3,4,5-P3	PI-3,4,5- trifosfato fosfatase
PI3K	Fosfatidilinositol-3- quinase

PIP2	Fosfatidilinositol bi- fosfato
PM	Peso molecular
QDF	Quebra da dupla fita
Ra	Rugosidade média superficial
RANK	Receptor ativador de <i>NF-κb</i>
RANKL	Ligante do receptor ativador de <i>NF-κb</i>
RAW 264.7	Linhagem de monócitos macrófagos de leucemia murina
rCDT	Toxina distensora citoletal recombinante
Rmax	Profundidade máxima de rugosidade
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT- PCR	Reação de transcriptase reversa seguida da reação de polimerase em cadeia
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa seguida da reação de polimerase em cadeia em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
SH-2	<i>Src Homology 2</i> (Homólogo ao Src –domínio de proteínas estruturalmente muito conservado em oncoproteína Src)
SHIP1	Inositol fosfatase 1 contendo o domínio SH-2
spp.	Espécie
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i> (proto-oncogene c-Src – fosforila resíduos específicos de tirosina quinase em outras proteínas)
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> (transdutor de sinal e ativador da transcrição -3)
Syk	<i>Splen tyrosine kinase</i> (tirosina quinase do baço)

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i> (Fator de transformação do crescimento beta 1)
TGF- β -R	<i>Transforming growth factor-β receptor</i> (receptor do fator de transformação do crescimento beta)
TNFR-1	<i>TNF Receptor-1</i> (receptor de fator de necrose tumoral 1)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (fator de necrose tumoral alfa)
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i> (fator 6 associado ao receptor TNF)
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral)
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> (fosfatase ácida tartarato-resistente)
Tris-HCl	Tampão hidroximetilaminometano – ácido clorídrico
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta
x	Vezes
Y-1	Células adrenocorticais Y1 de camundongos
α	Alfa
α -MEM	Alpha minimum essential medium (meio mínimo essencial alfa)
γ	Gama
κ	Kappa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivos específicos	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Obtenção de Aa(r)CDTA	37
<i>3.1.1 Purificação da Aa(r)CDT</i>	<i>37</i>
<i>3.1.2 Detecção das proteínas recombinantes</i>	<i>38</i>
<i>3.1.3 Reconstituição de Aa(r)CDT</i>	<i>38</i>
3.2 Cultivo celular	38
<i>3.2.1 Determinação do efeito da CDT sobre a viabilidade de células CHO 9</i>	<i>39</i>
<i>3.2.2 Atividade Aa(r)CDT na osteoclastogênese em células RAW 264.7 e BMC</i>	<i>39</i>
<i>3.2.2.1 Ensaio da diferenciação de Osteoclastos em células RAW 264.7</i>	<i>39</i>
<i>3.2.2.2 Ensaio do efeito da Aa(r)CDT sobre a diferenciação de osteoclastos em células monocíticas de medula óssea (BMC)</i>	<i>40</i>
<i>3.2.3 Viabilidade celular por MTT dos ensaios realizados com as células RAW 264.7 e BMC</i>	<i>40</i>
<i>3.2.4 Análise da diferenciação celular em osteoclastos dos ensaios realizados com as células RAW 264.7 e BMC</i>	<i>41</i>
<i>3.2.5 Análise da detecção da produção das citocinas</i>	<i>41</i>
<i>3.2.5.1 Citocinas IL1-β, IL-6, IL-10 e TNF-α</i>	<i>41</i>
<i>3.2.5.2 Citocina TGF-β</i>	<i>42</i>
<i>3.2.6 Expressão de genes associados à osteoclastogênese</i>	<i>42</i>
<i>3.2.6.1 Extração de RNA</i>	<i>42</i>
<i>3.2.6.2 Eficiência de amplificação</i>	<i>43</i>
<i>3.2.6.3 Quantificação da expressão gênica</i>	<i>43</i>
<i>3.2.7 Determinação da atividade osteoclástica</i>	<i>44</i>
<i>3.2.8 Análise estatística</i>	<i>46</i>
4 RESULTADOS	47
4.1 Detecção das proteínas recombinantes	47
4.2 Determinação do efeito da CDT sobre a viabilidade de células CHO 9	48

4.3 Análise da indução da diferenciação de osteoclastos em células RAW	49
.....	
<i>4.3.1 Análise da viabilidade celular pela adição de Aa(r)CDT de A. actinomycetemcomitans em células RAW 264.7 e em BMC</i>	49
<i>4.3.2 Análise da contagem das células multinucleadas TRAP positivas em células RAW 264.7 e em BMC pela adição de Aa(r)CDT de A. actinomycetemcomitans</i>	50
4.4 Análise dos níveis de citocinas produzidas por células RAW 264.7 e BMC na presença e ausência de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT	52
.....	
<i>4.4.1 Análise de níveis de IL-1β produzidos por células RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT</i>	52
<i>4.4.2 Análise de níveis de IL-6 produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT</i>	53
<i>4.4.3 Análise dos níveis de IL-10 produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT</i>	54
<i>4.4.4 Análise dos níveis de TNF-α produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT</i>	55
<i>4.4.5 Análise dos níveis de TGF-β produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT</i>	57
4.5 Expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese na ausência e presença de RANKL frente Aa(r)CDT	58
.....	
<i>4.5.1 Teste da eficiência da amplificação</i>	58
<i>4.5.2 Análise da quantificação da transcrição gênica de células RAW 264.7 em resposta a Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL</i>	58
<i>4.5.3 Análise da quantificação da transcrição gênica de células de medula óssea (BMC) de camundongos C57Bl/6 em resposta a Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL</i>	60
.....	
4.6 Determinação da atividade de reabsorção de tecido mineralizado	61
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76

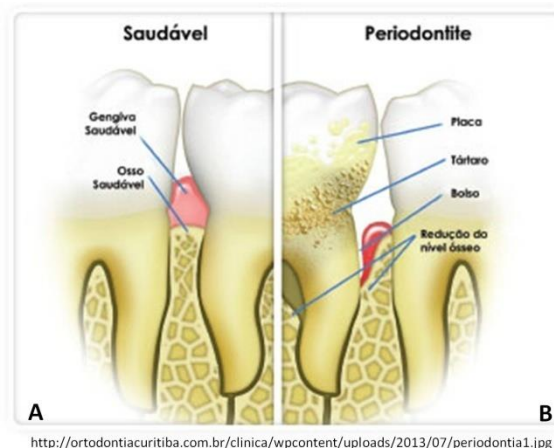
1 INTRODUÇÃO

As interações entre os micro-organismos subgengivais e o hospedeiro começam no epitélio gengival e estimulam a resposta inflamatória que confere uma eficiente proteção contra as bactérias. No entanto, a liberação de mediadores leva ao processo inicial de inflamação, resultando em gengivite. E a evolução para a periodontite ocorre com a exposição crônica das bactérias e/ou seus produtos, no epitélio gengival e ligamentos periodontais, desencadeiam a ativação da resposta imune inata e adquirida, podendo se desenvolver causando a destruição irreversível dos ligamentos periodontais e tecido ósseo (GRAVES;OATES; GARLET, 2011).

Em 1999 houve alteração na classificação das periodontites pela Academia Americana de Periodontia, classificando as periodontites com base na velocidade de destruição tecidual, em Periodontite Agressiva e Crônica, e subdivididas quanto ao número e localização de dentes afetados pela doença em Localizada ou Generalizada (ARMITAGE, 1999).

A periodontite agressiva é uma doença que acomete indivíduos clinicamente saudáveis, exceto pela presença da doença periodontal, caracteriza-se pela rápida perda de inserção e destruição óssea e ainda pela agregação familiar (ARMITAGE, 1999). Dentre as doenças periodontais, a periodontite agressiva é uma infecção rara de intensidade grave, podendo se apresentar em qualquer grupo étnico e idade, no entanto, é muitas vezes caracterizada pela idade precoce da manifestação clínica (PAPAPANOU, 1999).

Figura 1- Esquema do periodonto saudável e com periodontite



Nota: Desenho esquemático que exemplifica a periodontite. Em A imagem do periodonto saudável. Em B, periodontite. A placa ou biofilme dental constitui comunidade microbiana organizada aderida a superfície do dente através da ligação a proteínas da película adquirida. Tártaro (cálculo) é uma formação mineralizada decorrente da precipitação de fosfato de cálcio da saliva sobre o biofilme dental. Em resposta ao desafio microbiano, ocorre inflamação dos tecidos periodontais, que resulta em destruição do periodonto de sustentação e formação de bolsa periodontal, podendo ocasionar a perda do dente.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é considerado como o principal fator da iniciação e progressão na etiologia da periodontite (KAPLAN et al., 2002; OHGUCHI et al., 1998; PAJU et al., 1998), principalmente a periodontite agressiva (KOLODRUBETZ et al., 1996) e em alguns casos de periodontite crônica (ASIKAINEN; CHEN, 1999; CORTELLI et al., 2005). Esta espécie foi associada à microbiota residente do homem (NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006), e a presença de *A. actinomycetemcomitans* também pode ser detectada em indivíduos com periodonto sadio, sugerindo que estes pacientes poderiam albergar uma microbiota protetora (ASIKAINEN; ALALUUSUA; SAXEN, 1991; BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998).

O biofilme dental subgingival apresenta-se como o nicho primário de *A. actinomycetemcomitans*, principalmente em pacientes com periodontite agressiva localizada (MANDELL; SOCRANSKY, 1981; SLOTS; REYNOLDS; GENCO, 1980). Porém, este microrganismo pode ser detectado também na saliva (VON TROIL-LINDEN et al., 1996), superfícies mucosas e biofilme supragingival (DAHLEN et al., 1992).

A. actinomycetemcomitans foi associado a uma variedade de patologias infecciosas, incluindo doenças periodontais, endocardite, abscesso, osteomielite, pericardite, infecções urinárias e pneumonia (HENDERSON et al., 2003; NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006; ZAMBON, 1985).

Esta espécie foi considerada como parte do grupo HACEK, composto também por *Haemophilus parainfluenzae*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae*. O grupo HACEK é formado por bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas da orofaringe relacionadas com a endocardite bacteriana, sendo *A. actinomycetemcomitans* o mais prevalente em casos de endocardite (PATUREL et al., 2004).

A. actinomycetemcomitans foi primeiramente denominado *Bacterium actinomycetem comitans* em 1912 por KLINGER (ZAMBON, 1985). Em 1921, LIESKE observou as células individuais do microrganismo, denominando-o *Actinobacillus actinomycetem comitans* devido ao formato cocobacilar. O termo relativo à espécie, *actinomycetemcomitans*, refere-se à presença do microrganismo em lesões de actinomicose, em associação com *Actinomyces israeli*, segundo proposta de TOPLEY e WILSON em 1929 (ZAMBON, 1985).

Em 2006, *A. actinomycetemcomitans*, antes classificado no gênero *Actinobacillus*, passou a ser classificado no gênero *Aggregatibacter*, juntamente com *Aggregatibacter aphrophilus* (anteriormente *Haemophilus aphrophilus*) e *Aggregatibacter segnis*

(anteriormente *Haemophilus segnis*), com base em estudos de homologia DNA-DNA e análise filogenética de genes de manutenção (NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006).

O gênero *Aggregatibacter* faz parte da família *Pasteurellaceae* e são cocobacilos Gram-negativos, mesofílicos, anaeróbios facultativos, catalase positivos. No isolamento primário em meios sólidos, *A. actinomycetemcomitans* apresenta colônias circulares com bordas irregulares e translúcidas de característica rugosa, aderente e uma estrutura de aspecto estrelar no centro. Quando inoculadas em caldo, as amostras de colônias rugosas agregam-se e se aderem ao vidro. No entanto, após sucessivos repiques em meio de cultura sólido, as colônias tornam-se lisas (HENDERSON et al., 2003; NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006; ZAMBON, 1985).

Para o seu desenvolvimento este micro-organismo possui ainda como características bioquímicas o crescimento em meio de cultura sem a necessidade do fator hemina e é variável na necessidade do fator dinucleotídeo adenina nicotinamida, não produz hemólise, produz ácidos a partir de glicose, frutose e maltose, fermenta frutose, galactose, glicose, manose e lactose (NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006; SLOTS, 1982; ZAMBON, 1985).

Fatores de virulência são características que propiciam ao micro-organismo a capacidade de colonizar um nicho do hospedeiro e ultrapassar as barreiras de defesa iniciando um processo patológico (FIVES-TAYLOR et al., 1999).

A. actinomycetemcomitans apresenta fatores de virulência responsáveis pela colonização da cavidade oral, adesão à superfície mucosa, invasão ao tecido periodontal, evasão da resposta imune do hospedeiro causando a destruição de tecidos ósseos, ligamentares e fibroblásticos além da capacidade de inibir a reparação tecidual do hospedeiro (FINE et al., 2006; FIVES-TAYLOR et al., 1999; ZAMBON, 1985).

Entre os fatores de virulência produzidos por *A. actinomycetemcomitans*, podemos considerar adesinas (ROSE; MEYER; FIVES-TAYLOR, 2003), fímbrias (KACHLANY et al., 2001), produção de lipopolissacarídeo (LPS) (KATO et al., 2000), leucotoxina (KOLODRUBETZ et al., 1989) e toxina distensora citoletal (CDT) (MAYER et al., 1999; SHENKER et al., 1999; SUGAI et al., 1998).

A toxina distensora citoletal (CDT) foi descrita primeiramente em culturas de *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli*. O sobrenadante do meio cultivado com estes microrganismos quando inoculado em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) causaram distensão celular após um período de 2 a 5 dias, levando à morte celular (JOHNSON; LIOR, 1988a; b). Um curto período de exposição é suficiente para dar o início

aos eventos citotóxicos associados à ação desta toxina e mesmo após lavagens da cultura celular a ação da CDT é irreversível, implicando na existência de um receptor específico na superfície celular por onde se inicia a sinalização da internalização da CDT (ARAGON;CHAO; DEYFUS, 1997).

A CDT faz parte da família das citotoxinas termolábeis produzidas por várias espécies de bactérias Gram-negativas consideradas patógenos de mucosas como *Escherichia coli*, *Helicobacter* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Salmonella enterica* serovar *Typhi* e *Haemophilus ducreyi* (ARAGON; CHAO; DREYFUS, 1997; CHIEN et al., 2000; COPE et al., 1997; HAGHJOO; GALAN, 2004; JOHNSON; LIOR, 1988a; b; LARA-TEJERO; GALAN, 2001; OKUDA et al., 1997; PICKETT et al., 1994; PICKETT et al., 1996). Entre os periodontopatógenos, somente *A. actinomycetemcomitans* é capaz de produzir CDT, podendo ser este um fator de virulência importante na patogênese do *A. actinomycetemcomitans* (YAMANO et al., 2003).

CDT age em diferentes células eucariontes, causando distensão do citoplasma e bloqueio do ciclo celular nas fases G0/G1 ou G2/M, e induzindo a morte programada (BELIBASAKIS et al., 2004; MISE et al., 2005; OHGUCHI et al., 1998; SHENKER et al., 2001). A toxina de *A. actinomycetemcomitans* é capaz de agir sobre células epiteliais de carcinoma cervical (HeLa), de ovário de hamster chinês (CHO), de carcinoma bucal (KB) (FABRIS et al., 2002), fibroblastos gengivais, fibroblastos periodontais (BELIBASAKIS et al., 2002), linfócitos T (SHENKER et al., 2004), fibroblastos murínicos (FERNANDES et al., 2008), células epiteliais gengivais (ANDO, 2009) e monócitos / macrófagos (BANKS et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; MISE et al., 2005; XU et al., 2004). Esta toxina também possui uma ação imunorreguladora, sendo capaz de inibir a proliferação de linfócitos (SHENKER et al., 1999) e fibroblastos (BELIBASAKIS et al., 2002), estimulando a produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de humanos, aumentando a produção de citocinas pro-inflamatórias como interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e interferon γ (IFN- γ). Podendo também inibir a produção de IL-10, IL-12 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (AKIFUSA et al., 2001) e é capaz de inibir a fagocitose por macrófagos (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014).

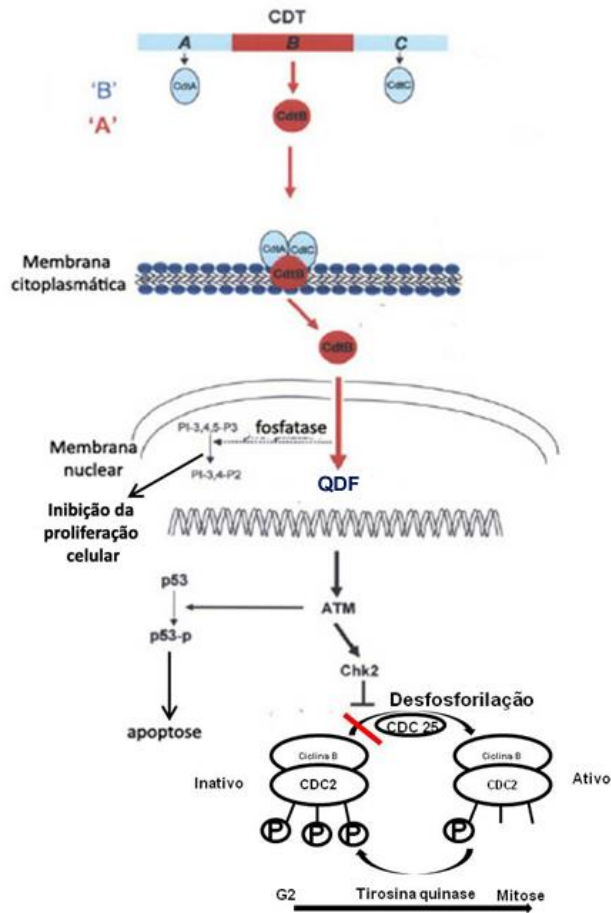
CDT é uma toxina do tipo AB₂, secretada em três subunidades (CDTA, CDTB e CDTC), cada uma com peso molecular entre 25 a 35 kDa (SHENKER et al., 1999). CDTB é a unidade ativa da toxina possuindo atividade DNase I (LARA-TEJERO; GALAN, 2000), enquanto CDTA e CDTC promovem a ligação à célula alvo, levando a CDTB ao interior da

célula do hospedeiro (CAO et al., 2008; LARA-TEJERO, 2001; MISE et al., 2005). Por outro lado, CDTB ativa uma cascata apoptótica por sua atividade de PI-3,4,5- trifosfato fosfatase (PI3,4,5-P3), similar a uma inositol fosfatase 1 contendo o domínio SH-2 (SHIP1), regulando a proliferação e sobrevivência de linfócitos em oposição a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e assim bloqueando a ativação de uma proteína quinase específica de serina / treonina cuja forma ativa controla o crescimento e a proliferação celular (SHENKER et al., 2007). A figura 1 demonstra de forma resumida a atividade da CDT em células eucarióticas.

Existem diferenças na sensibilidade das linhagens celulares às CDT de *A. actinomycetemcomitans*, *Campylobacter Jejuni*, *Escherichia coli* e *Haemophilus ducreyi*, devido as diferenças nos receptores que permitem a ligação da toxina a célula eucarionte, incluindo glicoproteínas e glicosfigosfólípidos (ESHRAGHI et al., 2010). Esta especificidade pode ser observada comparando-se as CDT de *E. coli* e *H. ducreyi*, dois patógenos que colonizam nichos muito distintos (trato digestivo e urinário respectivamente). CDT de *E. coli* e (Ec-CDT) e de *H. ducreyi* (Hd-CDT) possuem somente 22 e 19% de similaridade em CDTA e CDTC, respectivamente (PICKETT; WHITEHOUSE, 1999). Assim, devido a diferenças nas subunidades de ligação, Hd-CDT é mais tóxica que Ec-CDT, agindo em concentrações mais baixas na indução da fosforilação da proteína histona H2AX, um marcador de dano no DNA em células HeLa, CHO-K1, Balb/3T3, Y-1, OT-1, NIH/3T3, IC-21 e RAW 264.7. Além disso, Ec-CDT e Hd-CDT não competem pelo mesmo sítio de ligação sugerindo que estas são transportadas por mecanismos distintos mediadas por receptores de superfície diferentes (GARGI et al., 2013).

CDT é capaz de alterar o perfil de fatores inflamatórios produzidos por células de linhagem mieloide como macrófagos peritoneais murínicos (FERNANDES et al., 2008), células RAW 264.7 (ANDO, 2009) e células mononucleares periféricas (AKIFUSA et al., 2001). Aa(r)CDT é capaz também de induzir a distensão celular e causar o bloqueio da fase G2/M do ciclo celular em células monocíticas (MISE et al., 2005). Recentemente, em estudo comparando uma cepa de *A. actinomycetemcomitans* mutante deficiente em CDT e a selvagem, e com o uso de CDT recombinante, foi demonstrado neste laboratório que Aa(r)CDT é capaz de inibir a fagocitose por macrófagos murínicos, modular a produção de NO e induzir a produção de IL-1b, IL-12 e IL-10, mas não de TNF- α (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014). Este conjunto de dados indica que a CDT afeta a diferenciação de células monocíticas.

Figura 2 - Atividade da CDT em células eucarióticas.



Nota: A CDT é uma toxina do tipo AB₂, onde a CDTB é a parte ativa e a CDTA e CDTC participam da ligação e internalização da subunidade B na célula alvo. A atividade de DNase causa a quebra da dupla fita (QDF), ativando a proteína ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) que leva à ativação da proteína serina/treonina quinase (Chk2), responsável pelo bloqueio do ciclo celular na fase G₂. Alternativamente pode causar a apoptose pela atividade de fosfatase, por impedir a fosforilação de PIP₂ (fosfatidilinositol bi-fosfato).

Fonte: GE et al., 2008 -modificado

A. actinomycetemcomitans induz a periodontite agressiva, que é caracterizada por uma intensa reabsorção óssea. A periodontite é a mais comum das desordens ósseas em humanos e é induzida pela infecção subgingival por múltiplas espécies bacterianas. Essa perda óssea local parece ser mediada por células T ativadas pelas bactérias e seus produtos, induzindo a uma produção exacerbada de RANKL, estimulando a osteoclastogênese local (KAWAI et al., 2006; TENG et al., 2000).

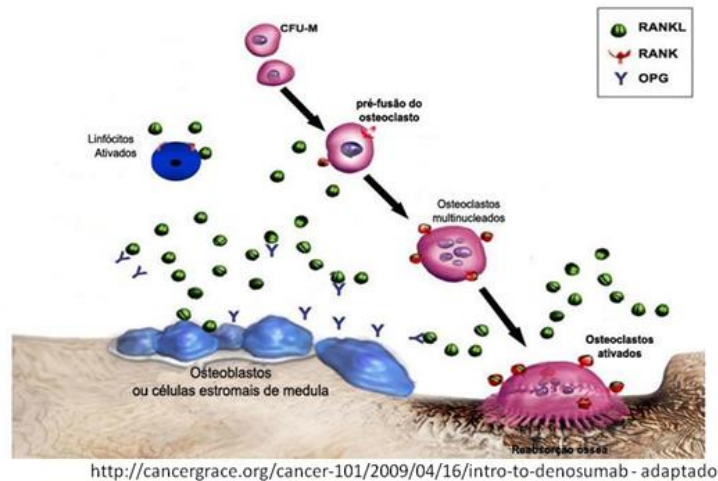
O osso é um tecido que passa por uma contínua remodelação, promovida por processos de reabsorção e neoformação. Inflamações crônicas podem alterar o metabolismo ósseo e promover o aumento da reabsorção óssea. A ativação de várias populações celulares do sistema imune inato e adaptativo, com produção de citocinas, não só perpetua a inflamação, mas também ativa a degradação óssea e inibe o mecanismo de reconstrução óssea (REDLICH; SMOLEN, 2012).

A quebra da homeostase óssea resulta em aumento na diferenciação e maturação dos osteoclastos, que se diferenciam a partir de células da família de monócitos / macrófagos, e sua função fisiológica é realizar reabsorção do tecido mineralizado (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; FACCIO et al., 2002). A osteoclastogênese ocorre principalmente pela ação de duas moléculas: (1) fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (RANKL), um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (TANAKA et al., 2006).

M-CSF é uma citocina essencial expressa por células osteoblásticas, que promove a expressão de RANK na membrana celular dos osteoclastos, levando a ligação de osteoclastos ativados ao ligante RANKL. Esta citocina auxilia na proliferação, diferenciação e sobrevivência de células pré-osteoclásticas com auxílio de proteínas extracelulares, que ativam as vias da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) / proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (Grb2) e a via de sinalização serina-treonina quinase (AKT)/ fosfatidil inositol quinase (PI3K). O M-CSF também pode ser ativado por moléculas co-estimulatórias como DAP12 (DNAX de ativação da proteína de 12 kDa) e Syk (tirosina quinase do baço) (ROSS; TEITELBAUM, 2005).

RANKL é produzida por células estromáticas de medula óssea, osteoblastos de periosteos (LACEY et al., 1998), linfócitos T (TAUBMAN; KAWAI, 2001) e fibroblastos (HSU et al., 1999). A ativação dos receptores RANK por RANKL em células progenitoras de osteoclastos leva a trimerização de RANK e ao recrutamento de uma molécula adaptadora - TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF) (figura 1). Esta molécula estimula uma cascata de sinalização que leva à diferenciação osteoclástica (ARMSTRONG et al., 2002), pela ativação do fator de transcrição NFATc-1 (fator nuclear c1 ativador de células T) que induz a transcrição de genes específicos à osteoclastogênese, que codificam TRAP (fosfatase ácida tartarato-resistente), integrina β 3, receptor para calcitocina e catepsina K (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007).

Figura 3 - Esquema representativo da reabsorção óssea

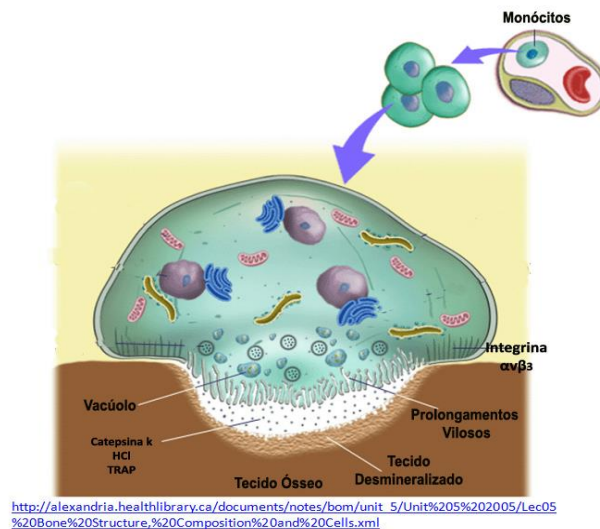


Nota: A osteoclastogênese é dependente da ligação entre RANK, presente na membrana celular de células pré-osteoclásticas (CFU-M) com seu ligante RANKL, produzido por células como os linfócitos e fibroblastos ativados. Esta ligação RANK-RANKL, induz à pré-fusão de osteoclastos levando à coalescência celular formando células multinucleadas, que tornam-se osteoclastos maduros (ativados), capazes de promover a reabsorção óssea.

Na reabsorção óssea, ocorre a formação de depressões da matriz óssea escavadas pela atividade dos osteoclastos e conhecidas como lacunas de Howship (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). A superfície ativa dos osteoclastos é voltada para a matriz óssea e apresenta prolongamentos vilosos irregulares que tem a forma de folhas ou pregas que se subdividem. Circundando essa área, existe uma zona citoplasmática, a zona clara, por onde os osteoclastos secretam fatores que levam a destruição óssea como TRAP (fosfatase ácida tartrato-resistente), HCl e catepsina K (CTPK) (BLAIR; ATHANASOU, 2004; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). A ligação ao tecido ósseo é feita por um anel citoplasmático denso de actina F que se liga à matriz por proteínas transmembrânicas, mediada pela integrina $\alpha_v\beta_3$ (NAKAMURA et al., 1999) que ativa a via da proteína quinase B (AKT/PKB), relacionada com a prevenção da apoptose (SONG; OUYANG; BAO, 2005). Após a ligação mediada pela integrina $\alpha_v\beta_3$, os osteoclastos promovem a acidificação do microambiente extracelular em um processo mediado pela H^+ - adenosina trifosfatase (H^+ - ATPase) vacuolar nas vilosidades. Os eventos de transporte de íons resultam na secreção de HCl levando a redução do pH $\sim 4,5$. Este ambiente ácido mobiliza o mineral ósseo. Posteriormente à desmineralização, o componente orgânico é degradado pela catepsina K. A catepsina K é um cisteíno-protease lisossomal, expressa em altos níveis por osteoclastos, que degrada colágeno tipo I, o qual constitui mais de 90% do colágeno do tecido ósseo (TEITELBAUM, 2000). Assim, são

considerados marcadores de osteoclastos a expressão de catepsina K, atividade fosfatase ácida tartarato – resistente (TRAP), secreção ácida, reabsorção lacunar em substrato mineralizado e presença de integrina $\alpha_v\beta_3$. A representação do osteoclasto maduro pode ser observada na figura 4.

Figura 4 - Esquema representativo de um osteoclasto.



Nota: Durante a reabsorção óssea, há a formação de depressões escavadas na matriz óssea pela atividade dos osteoclastos, conhecidas como lacunas de Howship. A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares, por onde os osteoclastos secretam fatores que levam a destruição óssea como TRAP (fosfatase ácida tartrato-resistente), HCl e catepsina K (ctpK). A ligação do osteoclasto com o tecido ósseo é mediada pela integrina $\alpha_v\beta_3$.

Osteoclastos podem ser obtidos a partir monócitos / macrófagos de linhagem ou de cultura primária como monócitos de medula óssea murínica e de aves de sangue periférico humano e macrófagos isolados de melanomas após estímulo com RANKL (HERMAN et al., 2008; LAU et al., 2004; SOLARI et al., 1996; VANDOOREN et al., 2009). A diferenciação dos osteoclastos pode ocorrer por diferentes vias de sinalização. Como por exemplo: NF κ B, JNKs/, ERK, e AKT que são ativadas por RANKL e M-CSF (CICEK et al., 2011).

As células precursoras de osteoclastos expressam vários receptores de citocinas, como IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6, e IL-17, que colaboram com a osteoclastogênese e são chamadas citocinas osteolíticas, com base no seu efeito de reabsorção óssea *in vivo* (BISHOP; MEYER; PIKE, 2009; LAM et al., 2000). Por exemplo, IL-1 α induz a ativação de ERK e NF- κ B, e TNF- α ativa NF- κ B em células pré-osteoclásticas, sendo que ERK é associada à sobrevivência de osteoclastos, enquanto a ativação de NF- κ B regula a ativação de osteoclastos para a reabsorção óssea (MIYAZAKI et al., 2000).

A osteoclastogênese segue uma ordem de transcrição onde a ativação de NF- κ B é seguida pela ativação de c-Fos e NFATc-1 (YAMASHITA et al., 2007). A proliferação e sobrevivência de células precursoras de osteoclastos necessitam da presença de M-CSF e fatores de transcrição como c-Fos, p50 e p52. Além disso, moléculas como a c-Src, TRAF-6 e integrina $\alpha_v\beta_3$ são necessárias para a polarização e maturação dos osteoclastos. Finalmente, após ativação dos osteoclastos, no sítio de ligação com o tecido mineralizado são detectados catepsina K, anidrase carbônica II e H⁺ - ATPase (TEITELBAUM, 2000).

Para ocorrer a reabsorção óssea, os osteoclastos se polarizam, ocorrendo a organização do citoesqueleto de actina F dentro de uma estrutura densa na forma de anel, vedando assim a área inferior às células, formando um compartimento fechado, em que a matriz óssea e o mineral pode ser reabsorvido, resultando na formação de sulcos de reabsorção (LAKKAKORPI; VAANANEN, 1991). Assim, a atividade osteoclástica pode ser determinada pelo nível de rugosidade da superfície após a adesão dos osteoclastos (GEBLINGER et al., 2012).

IL-1 β é uma importante citocina pró-inflamatória, produzida por várias células incluindo macrófagos e também atua em células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas que mediam a adesão de leucócitos para o local da inflamação. Além disso, IL-1 β está presente no fluido crevicular de pacientes com doença periodontal e em animais com doença periodontal experimental, a sua produção levou à reabsorção óssea (GARLET et al., 2006). No entanto, existem dados contraditórios em relação aos níveis de IL-1 β e a osteoclastogênese, pois os dados sugerem que esta citocina também pode ser capaz de induzir a inibição da produção de RANKL (LEE et al., 2010).

IL-6 é produzida por linfócitos, monócitos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos e células tumorais (KISHIMOTO et al., 1995). Esta citocina é expressa em resposta a infecção, trauma ou desafio imunológico (KISHIMOTO et al., 1995) e possui homologia com uma grande família de citocinas composta por: IL-11, fator ciliar neutrofílico (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1), citocinas cardiotrofina-like (CLC), fator inibidor de leucemia (LIF), neuropoietina (NPN), oncostatina M (OSM), IL-27 e IL-31 que está relacionada com a regulação da resposta na fase aguda de uma infecção (HEINRICH et al., 2003; PABLOS ALVAREZ, 2009). Esta família de citocinas partilha o uso de um receptor, a glicoproteína 130 (gp 130) presente em quase todas as células de mamíferos. Porém, para que a ligação entre IL-6 e gp 130 ocorra, há a necessidade também da presença do receptor de IL-6 (IL-6R). IL-6R é expresso por hepatócitos, neutrófilos, monócitos / macrófagos e alguns linfócitos, podendo ser encontrado na forma solúvel em ambientes onde inflamados. Assim,

IL-6 juntamente com IL-6R e o receptor gp 130 ativam a fosforilação intracelular (PABLOS ALVAREZ, 2009) de uma proteína intracelular chamada Janus quinase (Jak), que ativa o ativador de transcrição (STAT-3). STAT-3 atravessa para o núcleo e ativa a expressão dos genes alvo (HEINRICH et al., 2003). Além de STAT3, o receptor gp130 ativa a via das MAPK (quinase ativada por mitógenos) e a via PI3K/Akt, ambas de relevância na indução de fatores pró-inflamatórios de sobrevivência celular (HEINRICH et al., 2003).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória secretada por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, produzida frente a estímulos, principalmente de LPS. Esta citocina faz parte da mesma família que RANKL, estimulando a expressão de *cathepsina k* em pré-osteoclastos e em osteoclastos maduros (CORISDEO et al., 2001) e colabora na sobrevivência celular de células pré-osteoclásticas juntamente com M-CSF (KOBAYASHI et al., 2000a).

O papel da TNF- α na osteoclastogênese parece ser contraditório. Enquanto estudos demonstram que esta citocina possui atividade diretamente na ativação de osteoclastos independente de RANKL *in vivo* e *in vitro* (FULLER et al., 2002), outros trabalhos sugerem que esta citocina não induz a formação de osteoclastos (LAM et al., 2000). No entanto, a presença desta citocina parece agir de forma sinérgica quando associada à RANKL na ativação da diferenciação de osteoclastos (FULLER et al., 2002; LAM et al., 2000). Outros trabalhos sugerem a necessidade da presença de TNF- α juntamente com IL-1 α para que a osteoclastogênese ocorra (KOBAYASHI et al., 2000b). Em estudo *in vivo* com ratos deficientes em TNF- α , foram observadas menor inflamação e perda óssea em ensaio de periodontite experimental (GARLET et al., 2007).

Camundongos *knockout* no receptor TNF (TNFR-1) após inoculação de *A. actinomycetemcomitans*, apresentaram menor desenvolvimento de inflamação, indicando uma menor produção de citocinas e menor perda óssea associada a menor produção de RANKL. Além disso, os níveis de mRNA de IL-1 β , IFN- γ e RANKL no tecido gengival se apresentaram menores em relação ao tecido gengival de camundongos selvagens (GARLET et al., 2007).

Alguns fatores apresentam capacidade de inibir a osteoclastogênese como IL-10, osteoprotegerina (OPG), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e o fator regulatório de interferon 8 (IFR-8).

TGF- β é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células. Na osteoclastogênese, ele pode inibir a formação e estimular a apoptose de osteoclastos humanos e murínicos (CHENU et al., 1988; ROUX et al., 2005).

OPG, derivada de osteoblastos, é um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF), que regula negativamente a osteoclastogênese, inibindo a diferenciação das células precursoras de osteoclastos (BELIBASAKIS et al., 2005a; SIMONET et al., 1997; UDAGAWA et al., 1999). Esta proteína possui uma afinidade ao receptor que ativa o NF- κ B (RANK), bloqueando assim a ligação RANK-RANKL.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória sintetizada principalmente por células T e macrófagos ativados. É uma citocina do tipo II e faz parte da família de citocinas que incluem IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (MOSSER; ZHANG, 2008). IL-10 suprime a reabsorção óssea em cultura de células de medula óssea de camundongos MF-1 (OWENS; GALLAGHER; CHAMBERS, 1996) e também age diretamente em células monocíticas precursoras de osteoclastos, inibindo a expressão de NFATc-1 (EVANS; FOX, 2007).

O fator regulatório de interferon 8 (IRF-8) é relacionado com a regulação negativa da osteoclastogênese. A ausência desta proteína promove um aumento no número de osteoclastos causando osteoporose severa (ZHAO et al., 2009). IRF-8 é expresso especificamente por células do sistema imunológico incluindo monócitos / macrófagos, linfócitos B e linfócitos T ativados (NELSON et al., 1996). Este fator se liga a NFATc-1 suprimindo a transcrição do DNA, inibindo a expressão de NFATc-1 e então bloqueando a diferenciação de osteoclastos (ZHAO et al., 2009).

A. actinomycetemcomitans apresenta capacidade de induzir a expressão de RANKL por células de tecidos conectivos e células T derivadas de diferentes linhagens. A Aa(r)CDT induz a produção de RANKL por fibroblastos, sugerindo papel desta toxina no processo de reabsorção óssea (BELIBASAKIS et al., 2005a; 2008). No entanto, as evidências sugerem que CDT poderia participar da osteoclastogênese atuando diretamente sobre as células precursoras de osteoclastos interferindo no processo de diferenciação, por ação direta ou pela indução de citocinas osteolíticas.

Células mononucleares do sangue periférico de humanos expostos a Aa(r)CDT, produzem maiores níveis de citocinas como IL-1 β e IL-6 (AKIFUSA et al., 2001) que participam da indução da diferenciação celular de monócitos / macrófagos em osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Dados deste laboratório mostraram que Aa(r)CDT afeta a função

de macrófagos e modifica o perfil de citocinas produzidas por macrófagos murínicos, estimulando a produção de IL-1 β , IL-12 e IL-10 (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014).

A periodontite é uma doença inflamatória que ocorre em resposta microbiota subgingival, destruindo os tecidos de suporte dental (GARLET et al., 2004). A progressão desta patologia está associada não somente à quantidade de microrganismos e a resposta do hospedeiro a infecção, mas também é dependente da expressão de produtos bacterianos produzidos pelos microrganismos que associados à colonização, evasão das defesas e destruição tecidual do hospedeiro (FIVES-TAYLOR et al., 1999).

Assim, formulamos a hipótese de que Aa(r)CDT altera a homeostase óssea não somente por induzir a produção de RANKL por fibroblastos, mas também por interferir na diferenciação de células pré-osteoclásticas. Para o melhor entendimento do papel da CDT de *A. actinomycetemcomitans* sobre células precursoras de osteoclastos, o objetivo do presente estudo foi analisar se a CDT de *A. actinomycetemcomitans* em doses sub letais, seria capaz de interferir na sobrevivência, diferenciação de células precursoras de osteoclastos e sobre a atividade de reabsorção de tecido mineralizado.

2 OBJETIVOS

Baseados no exposto nos propomos a determinar o efeito da atividade da toxina distensora citoletal de *A. actinomycetemcomitans* (Aa(r)CDT) sobre osteoclastogênese e atividade osteoclástica em macrófagos murínicos RAW 264.7 e em células de medula óssea (BMC) de camundongos C57BL/6.

2.1 Objetivos específicos

- Análise da viabilidade celular após a adição da CDT em RAW 264.7 e BMC na presença e ausência de RANKL.
- Análise da diferenciação celular por contagem de células TRAP positivas após de coloração TRAP.
- Análise do perfil de citocinas produzidas pelas células em resposta da CDT e na indução da osteoclastogênese por RANKL.
- Análise da expressão de genes relacionados com a osteoclastogênese por reação de polimerização de cadeia em tempo real quantitativo.
- Determinação da atividade dos osteoclastos diferenciados em tecido mineralizado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

3.1 Obtenção de Aa(r)CDT

3.1.1 Purificação da Aa(r)CDT

Para a purificação das proteínas foram utilizadas cepas recombinantes de *E.coli* BL21(DE) pET15bcdtA, *E.coli* BL21(DE) pET15bcdtB e *E.coli* BL21(DE) pET15bcdtC contendo o gene da CdtA, CdtB e CdtC, respectivamente (MAO; DIRIENZO, 2002), os quais possuem cauda de histidina para purificação por coluna de resina níquel-quelante. As bactérias foram descongeladas do freezer -80 °C e plaqueadas em placas de LB contendo ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37 °C por 16 horas. A seguir, uma colônia de cada recombinante foi colocada em 10 ml de caldo LB acrescido de ampicilina (100µg/ml), seguindo-se incubação sob agitação a 250 rpm a 37 °C por 16 horas. Estas culturas foram inoculadas em 500 ml de caldo LB contendo ampicilina e deixadas sob agitação a 250 rpm a 37 °C até que atingisse a fase logarítmica de 0,8 ~1,0 a um comprimento de onda de 600 nm. Acrescentou-se, então, 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA), e foi mantida incubação sob agitação por mais 5 horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 6000 xg por 10 minutos a 10 °C e armazenadas em freezer -20 °C até que se realizasse a sonicação.

Em seguida, o precipitado bacteriano foi ressuspensão em 10 ml de tampão de ligação (estoque 8 x; 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 40 mM imidazole, pH 7,9) e lisado por sonicação (Braun- Sonic 2000, B. Braun Biotech, EUA) com 2 ciclos, sendo um de 3 minutos e outro de 2 minutos, com intervalo de 1 minuto entre os ciclos e mantidos a 0 °C. Os lisados bacterianos foram centrifugados a 6000 xg, por 15 minutos. O precipitado contendo os corpúsculos de inclusão foram ressuspensos em 1x tampão de ligação contendo 6 M de uréia, agitados e sonicados com o mesmo ciclo exposto anteriormente. Estes foram, então, deixados sob agitação em câmara fria por 1 hora, para então serem centrifugados e coletados os sobrenadantes contendo as proteínas a serem purificadas.

A coluna de resina níquel-quelante foi pré-preparada com 1,5 ml de resina conforme as instruções do fabricante (lavagens com 3 x do volume da resina com água destilada, adicionadas 5 x o volume da resina de 1 x charge buffer contendo 0,4 M de NiSO₄, e por último colocados 3 x o volume da resina de 1 x tampão de ligação contendo 6 M de uréia)

(His Binding Resin, Novagen, EUA). Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de nitrocelulose de poro 0,45 µm (Millipore, EUA) e passados na coluna.

Em seguida, foram feitas sucessivas diálises de 1 hora cada em câmara fria (4 M, 3 M, 2 M e 1 M de uréia) utilizando-se de uma membrana de diálise de diâmetro de poro 10K MWCO para promover a reestruturação da proteína.

3.1.2 Detecção das proteínas recombinantes

Tanto os precipitados como os sobrenadantes dos lisados bacterianos das culturas de bactérias recombinantes após a indução foram analisados através de corrida eletroforética em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Assim, 40 µl das amostras foram diluídas em 13 µl de tampão da amostra (0,05M Tris pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de, 5% β-mercaptanol, 0,025% azul de bromofenol e 37% de água deionizada) e fervidas em banho-maria por 5 minutos.

As amostras foram aplicadas e a eletroforese realizada em gel de poliacrilamida a 10% em uma corrente constante de 30 mA por 2 horas. Como marcador utilizou-se o padrão High Range Marker (Bio-Rad, CA, EUA). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado pelo método de Comassie Blue (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A quantidade de proteína em cada lisado bacteriano foi determinada utilizando o reagente Bradford concentrado de ensaio de proteína (Bio Agency Tecnologia Diagnóstico Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Os resultados da leitura de absorbância, medida a uma densidade óptica de 595 nm, foram comparados com uma escala controle feita com albumina.

3.1.3 Reconstituição de Aa(r)CDT

Após a diálise, as frações da toxina (rCDTA, rCDTB e rCDTC) foram misturadas, mantidas sob agitação a 0 °C por 1 hora para a reconstituição da toxina. Após a reconstituição, as frações não ligadas foram removidas através de filtração em membranas filtrantes Amicon (Millipore, EUA) com recuperação de proteínas com pesos acima de 50 kDa, uma vez que quando reconstituída, a Aa(r)CDT deve apresentar o tamanho aproximado de 84 kDa. Após a filtração, a proteína foi quantificada através do método de Bradford.

3.2 Cultivo celular

Macrófagos murínicos RAW 264.7 (linhagem de macrófagos peritoneais imortalizadas de camundongos com leucemia) e células de ovário de hamster chinês (CHO) foram

cultivados e mantidos em meio DMEM (Gibco, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica: 10000 U/ml de penicilina G (ICN Biomedicals, EUA) e 100 U/ml de sulfato de estreptomicina (Calbiochem, Alemanha), em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C (Shel Lab).

3.2.1 Determinação do efeito da CDT sobre a viabilidade de células CHO 9

Foram realizados ensaios do efeito da Aa(r)CDT de *A. actinomycetemcomitans* na linhagem celulares CHO 9 (células epiteliais de ovário de hamster chinês), conhecidas pela sua sensibilidade à toxina. Foram inoculadas 1X10⁵ células em meio DMEN-AS em poços de placas de cultura celular de 96 poços. A seguir, foram adicionadas alíquotas da Aa(r)CDT reconstituída a partir da concentração de 200 µg/ml.

Após 48 horas foi realizado ensaio de viabilidade com a adição 5mg/ml de solução de MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- brometo difeniltetrazólio] (Sigma-Aldrich) por poço e incubado a 37 °C por 3 horas. Seguiu-se a adição de 100 µl de solução de SDS (10%) e incubação por 18 horas a 37 °C. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (DO 595 nm). Viabilidade de 100% foi considerada para os valores de DO obtidos nas amostras de poços controle, contendo somente células CHO 9. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.2 Atividade CDT na osteoclastogênese em células RAW 264.7 e BMC

3.2.2.1 Ensaio da diferenciação de Osteoclastos em células RAW 264.7

Foram inoculadas 5 X 10³ células RAW 264.7 em meio α-mem (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado [gentamicina 50 µg/ml (Gibco), 1% de solução de antibiótico contendo 100 U/ml de penicilina (ICN Biomedicals) e 100 mg/ml de estreptomicina (Calbiochen, Darmstadt, Alemanha), 2,20 g/l de bicarbonato de sódio (Mallinckrodt Baker, Paris, KT, EUA) e suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), L-Glutamina (200 mM) (Sigma-Aldrich), MEM aminoácidos não essenciais (Gibco)], em poços de placas para cultivo de células com 96 poços. A seguir, os poços foram acrescidos ou não de 50 ng/ml de RANKL (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) (NAGATA et al., 2003), visando determinar se o efeito da CDT seria dependente ou não de RANKL. Alíquotas nas concentrações de 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,12 µg/ml e 1,5 µg/ml de Aa(r)CDT reconstituída foram adicionadas a cada poço.

As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 10% de CO₂. A cada 2 dias, alíquotas correspondentes a 50% do meio de cultura foram removidas de cada poço, e foram acrescidos o mesmo volume de meio fresco com ou sem a adição de 50 ng/ml de RANKL.

3.2.2.2 Ensaio do efeito da CDT sobre a diferenciação de osteoclastos em células monocíticas de medula óssea (BMC)

Células de medula óssea (BMC) de camundongos C57BL/6, com idade de 6-8 semanas foram obtidas dos ossos longos (fêmur e tíbia). Após a retirada dos fêmures, estes foram mantidos em meio DMEM em gelo, para o transporte do biotério ao laboratório. As epífises dos ossos foram cortadas e a medula removida com 2 ml de DMEM com a utilização de uma seringa. Após, foi realizada a separação dos monócitos com Histopaque 1083 (Sigma), as BMC foram ressuspensas em meio α -MEM e contadas em câmara de Neubauer.

Alíquotas contendo 2×10^5 células de medula óssea foram adicionadas a poços de placas de 96 poços (Corning–Costar), em meio α -MEM (Sigma) completo. Os meios foram acrescidos de M-CSF (20 ng/ml) ou RANKL (50 ng/ml) e M-CSF (20 ng/ml). Aos poços foram acrescidas as toxinas reconstituídas a partir da concentração de 25 μ g/ml que foram diluídas em série a cada poço e as placas incubadas a 37 °C em atmosfera de 10% de CO₂ por 6 dias de incubação e a cada 2 dias foi feita a manutenção do meio de cultura retirando 50% do meio e adicionando o mesmo volume. Como controles foram utilizadas as células contendo M-CSF ou M-CSF/RANKL. Osteoprotegerina (OPG) foi adicionada como controle negativo para investigar se a diferenciação das células em osteoclastos ocorreu em resposta de RANKL assim, como controle negativo foram adicionadas às células o meio contendo M-CSF (20ng/ml), RANKL (50 ng/ml) e OPG (100 ng/ml).

3.2.3 Viabilidade celular por MTT dos ensaios realizados com as células RAW 264.7 e BMC

Após 6 dias foram adicionados 5mg/ml de solução de MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- brometo difeniltetrazólio] (Sigma-Aldrich) por poço e incubado a 37 °C por 3 horas. Seguiu-se a adição de 100 μ l de solução de SDS (10%) e incubação por 18 horas a 37 °C. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (DO 540 nm). Viabilidade de 100% foi considerada para os valores de DO obtidos nas amostras de poços controle. Para os experimentos com as células RAW 264.7, somente com células RAW 264.7 ou RAW 264.7 acrescidas de RANKL

e para os experimentos com BMC as BMC acrescidas com M-CSF ou BMC acrescidas de M-CSF e RANKL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.4 Análise da diferenciação celular em osteoclastos dos ensaios realizados com as células RAW 264.7 e BMC

Além disso, após 6 dias de incubação, foi realizada a coloração TRAP utilizando o kit de fosfatase ácida (Sigma-Aldrich), realizada após padronização do protocolo. Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com 100 µl de PBS, e fixadas com 50 µl da solução de fixação por 30 segundos. Após lavagem com água destilada, foram aplicados 100 µl da solução B [900 µl de água destilada a 37 °C, 2 µl de solução granada permanente - GBC *fast garnet GBC base* (7 mg/ml) com nitrito de sódio (0,1 mol/l), 1 µl de solução de ácido fosfórico naftol AS-BI (12,5 mg/ml), 4 µl de solução acetato (2,5 mol/l) e 2 µl de solução tartarato]. Após incubação a 37 °C por 25 minutos, foi realizada lavagem com água destilada e secagem temperatura ambiente.

Foi então realizada contagem de células TRAP positivas, apresentando mais de 3 núcleos em nove campos por poço, calculada a média de células TRAP+/poço, seguindo-se o cálculo da média e desvio padrão do número de células TRAP+ para cada condição estudada, em ensaio em triplicata.

3.2.5 Análise da detecção da produção das citocinas

3.2.5.1 Citocinas IL1-β, IL-6, IL-10 e TNF-α

A produção de citocinas IL1-β, TNF-α, IL-10, IL-6 foi avaliada por ELISA no sobrenadante das culturas obtidas nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2, com o uso de kits comerciais (Peprotech, NJ, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 100 µl de solução de anticorpo de captura (1 µg/ml) por poço em placas de 96 poços (Corning, NY, EUA), sendo incubadas a temperatura ambiente por 16 horas. Após lavagem, foram adicionados 300 µl de solução bloqueadora contendo 1 % de BSA e 1 % sacarose em PBS/Tween 20 a 0,1%, incubados por 1 hora a temperatura ambiente e então adicionados os padrões e os sobrenadantes dos ensaios em um volume de 100 µl. As placas incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção a (0,25 µg/ml) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada uma solução de conjugado avidina-peroxidase (1:2000) e incubada por 30 minutos. Entre cada etapa, os poços foram lavados 4 vezes com solução de PBS/Tween 20 a 0,1%. A reação foi

revelada pela adição do substrato OPD (o-phenylenediamine) (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato, 50 mM, pH 5,0 e incubada por 10 minutos e bloqueada com 2,5 N de solução de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 405nm em leitor de ELISA (BioRad, EUA). Os valores da absorbância obtidos foram comparados à curva padrão e os resultados expressos em ng/ml.

3.2.5.2 Citocina TGF- β

A produção de TGF- β foi avaliada por ELISA no sobrenadante das culturas obtidas nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2, com o uso de kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 100 μ l de solução de anticorpo de captura por poço em placas de 96 poços (Corning, NY, EUA), sendo incubadas a 4 °C por 16 horas. Após a lavagem, foram adicionados 200 μ l de solução bloqueadora incubados por 1 hora a temperatura ambiente e então adicionados os padrões e os sobrenadantes dos ensaios em um volume de 100 μ l. As placas incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada uma solução de conjugado avidina-peroxidase e incubada por 30 minutos. Entre cada etapa, os poços foram lavados 5 vezes com diluente de ensaio. A reação foi revelada pela adição da solução substrato por 15 minutos e bloqueada com 1 M de solução de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 405 nm em leitor de ELISA (BioRad, EUA). Os valores da absorbância obtidos foram comparados à curva padrão e os resultados expressos em ng/ml.

3.2.6 Expressão de genes associados à osteoclastogênese.

A expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese foi determinada por reação de transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia em tempo real.

3.2.6.1 Extração de RNA

Após o ensaio descritos nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2, as células foram lavadas com PBS, armazenadas em 100 μ l de RNAlater (Ambion / LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EUA) a -20 °C até a extração de RNA.

A extração de RNA total foi realizada com TRIZOL Reagent (Ambion / LifeTechnologies) conforme as instruções do fabricante e a concentração e qualidade do RNA total foram determinadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND 1000, Peqlab, Erlangen,

Germany). O DNA complementar (cDNA) foi transcrito utilizando 1 µg de RNA total em uma reação total de 20 µL, contendo 200 U de Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), 10 mM dNTP, 50 ng/µL hexâmeros randômicos e 40 U de inibidor de RNase (RNase inhibitor RNase OUT, Invitrogen). As misturas das reações foram incubadas a 25 °C / 10 minutos, seguindo-se 50 °C / 50 minutos e 85 °C / 5 minutos, em termociclador (GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer Co, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.2.6.2 Eficiência de amplificação

Com o intuito de avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada gene-alvo, 2×10^3 células RAW 264.7 que foram incubadas em meio de cultura α -mem suplementado [gentamicina 50 µg/ml (Gibco), 1% de solução de antibiótico contendo 100U/ml de penicilina (ICN Biomedicals) e 100 mg/ml de estreptomicina (Calbiochen, Darmstadt, Alemanha), 2,20 g/l de bicarbonato de sódio (Mallinckrodt Baker, Paris, KT, EUA) e suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), L-Glutamina (200 mM) (Sigma-Aldrich), MEM aminoácidos não essenciais (Gibco)], em poços de placas para cultivo de células com 96 poços a 37 °C em atmosfera de 10% de CO₂. A cada 2 dias, alíquotas correspondentes a 50% do meio de cultura foram removidas de cada poço, e foram acrescidos o mesmo volume de meio fresco por 6 dias. Após este período foi feita a extração de RNA e a RT-PCR para a obtenção do cDNA e quantificada em espectrofotômetro (Nanodrop ND 1000) onde foi feita uma diluição seriada para a obtenção de concentrações a 358; 179; 89,5 e 47,5 ng/µl de cDNA por diluições seriadas de cDNA que foram submetidas à amplificação nas mesmas condições acima citadas. O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de CT foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado.

3.2.6.3 Quantificação da expressão gênica

A quantificação da expressão de genes relacionados à osteoclastogênese foi realizada por reação de polimerase em tempo real (qPCR). Foram utilizados 100 ng de cDNA nas reações de 20 µl utilizando os ensaios inventariados para o sistema TaqMan (Applied Biosystems) (1 µl) para os genes rank (Mm 00437135_m1), ctpk (Mm 00484039_m1), nfatc-1 (Mm 00479445_m1) e irf-8 (Mm 00492567_m1) acrescidos de 10 µl de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação foi realizada em termociclador

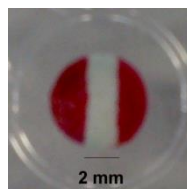
(Step one Plus Real-Time PCR system, Applied Biosystems), programado para as condições de amplificação: 50 °C / 2 minutos 95 °C / 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95 °C / 15 minutos e 60 °C / 1 minuto. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valores individuais de CT, que foram a seguir transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o tratamento realizado (com ou sem RANKL e as diferentes concentrações de Aa(r)CDT) e normalizadas com o gene de referência gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase (gapdh - Mm 99999915_g1). A análise da quantificação relativa foi feita utilizando o método comparativo do $\Delta\Delta C_t$ (PFAFFL, 2001).

3.2.7 Determinação da atividade osteoclástica

Para determinar se a CDT induz a formação de osteoclastos funcionais na presença e ausência de RANKL, foram realizados ensaios de reabsorção de dentina conforme descrito por (VANDOOREN et al., 2009).

Foram utilizados discos de dentina (Osteosite dentin discs, Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, Reino Unido). Com a finalidade de manter uma superfície de referência (não submetida aos osteoclastos) para determinação da profundidade da lesão induzida pelos osteoclastos, foram aplicadas duas camadas de esmalte de unha nas laterais do disco (Risque, Niasi, Taboão da Serra, São Paulo, Brasil), deixando-se uma janela central com cerca de 2,0 mm nos discos de dentina como demonstrado na figura 5.

Figura 5 - Discos de dentina preparados para o início do experimento.



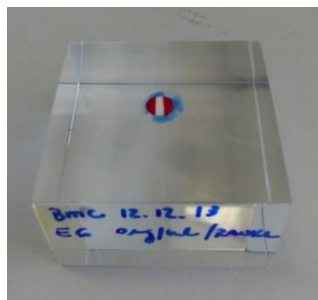
Nota: Discos de dentina (5,0 mm de diâmetro) protegido com esmalte de unha cosmético (cor vermelha). Área exposta aos osteoclastos (janela central) e área não exposta (2,0 mm) (interface controle-reabsorção-controle) na cor vermelha.

Após 24 horas, os discos foram imersos em α -MEM com 1 \times antibiótico (32,8 IU/ml de penicilina G, 10 μ g/ml de gentamicina e 0,05 μ g/ml de fungizone) por 10 minutos por duas vezes e incubados com o α -MEM com 1 \times antibiótico overnight a 37 °C. Após, os discos de

dentina foram lavados e incubados em α -MEM completo a 37 °C por 2 horas antes do uso (GOLDBERG et al., 2012).

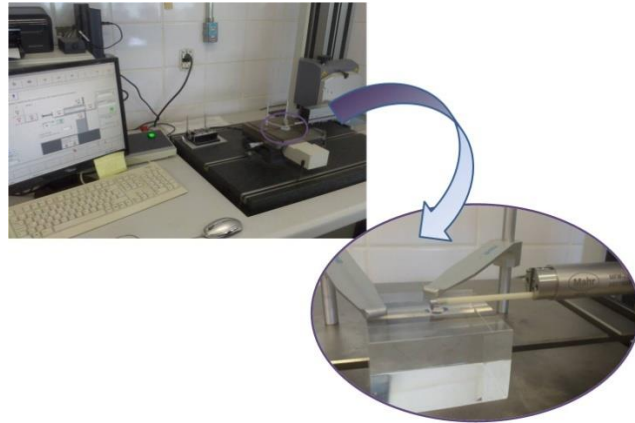
Para a realização do experimento, foram utilizadas células monocíticas RAW 264.7 ou BMCs, nas concentrações de 5×10^3 células/poço de macrófagos RAW 264.7 ou 2×10^5 células de BMC foram adicionadas na superfície de discos de dentina dispostos em placa de 96 poços e acrescidas de Aa(r)CDT nas concentrações de 25 e 12,5 $\mu\text{g/ml}$, na ausência e presença de 50 ng/ml RANKL e, nas BMC foram adicionadas além de Aa(r)CDT e RANKL, 20 ng/ml de M-CSF como descrito nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2. As células foram cultivadas por 3 semanas, sendo parte do meio trocado a cada dois dias, como descrito anteriormente. Foram empregados controles sem adição de Aa(r)CDT e com e sem adição de 100 ng/ml de OPG e 100 ng/ml de RANKL. Após este período os discos de dentina foram lavadas 3 vezes com hipoclorito de sódio 70% para remover as células aderentes e por 2 vezes com água deionizada. Os discos de dentina secos foram fixados em placas de acrílico (4 X 4 X 2 cm) com cera pegajosa azul como ilustrado na figura 6. E retirado o esmalte com acetona.

Figura 6 - Foto do disco de dentina fixado nas placas de acrílico.



O perfil de rugosidade dos discos de dentina foi avaliado através um Perfilômetro (MarSurf GD 25, Mahr, Göttingen, Alemanha), acoplado a u microcomputador através do software de contorno (MarSurf XCR 20) figura 7.

Figura 7 - Foto do perfilômetro e do posicionamento da placa com o disco de dentina para a análise.



Nesta metodologia, a ponta apalpadora foi colocada em uma das laterais (referencia protegida por esmalte) onde foram feitas 2 leituras a uma distância de $0,25\ \mu\text{m}$. E 4 leituras da área exposta às células a $0,25\ \mu\text{m}$ cada e mais 2 leituras da outra área controle a $0,25\ \mu\text{m}$ cada uma, realizando um percurso de apalpe de aproximadamente $2,5\ \text{mm}$ no eixo X.

Portanto, por disco representou a média de quatro leituras e foi feita a análise da média aritmética de rugosidade (RA) e a leitura da maior rugosidade (Rmax). Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.8 Análise estatística

O teste de análise de variância ANOVA juntamente com o pós-teste de comparação múltipla de Tukey, foi utilizado para determinar o efeito de CDT sobre a viabilidade celular, da produção de citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes, contagem de células TRAP positivas dos experimentos de osteoclastogênese. Para o dados dos resultados de RT-qPCR e análise de rugosidade dos discos de dentina, foram utilizados o teste ANOVA dois fatores seguido do pós-teste Bonferroni para comparar as médias das replicatas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção das proteínas recombinantes

Após a purificação das proteínas recombinantes rCDTA, rCDTB e rCDTC foi feita a curva padrão para quantificar as proteínas como apresentada na figura 8. Conforme pode ser observado, a correlação entre absorvância a 595 nm e concentração de albumina bovina se mostrou linear para concentrações de albumina variando entre 0 e 500 µg/ml. A partir desta calibração foi calculado a concentração das proteínas. Para a rCDTA foi recuperada 113,76 µg/ml; para rCDTB 382,17 µg/ml e para rCDTC 223,76 µg/ml. A confirmação das proteínas foi feita no gel de poliacrilamida onde foi colocado 20 µl da mistura proteína e corante (loading buffer) obtendo uma massa final de 1,4; 4,88 e 2,85 µg de rCDTA, rCDTB e rCDTC respectivamente em cada poço (figura 9).

Após esta quantificação foi feita a reconstituição da proteína como descrito no item 3.1.3 e uma nova quantificação pelo método de Bradford obtendo a Aa(r)CDT em uma concentração de 1581,59 µg/ml.

Figura 8 - Gráfico da curva elaborada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford

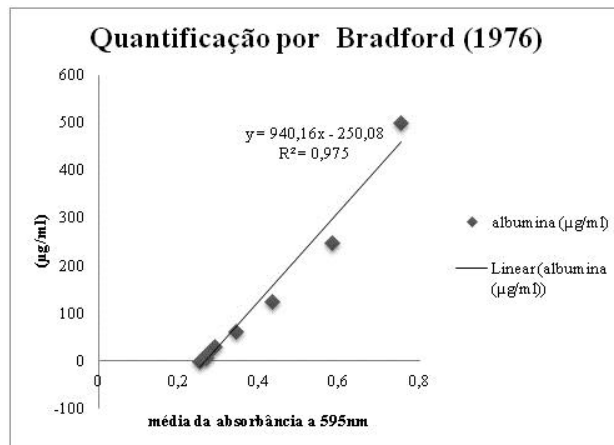
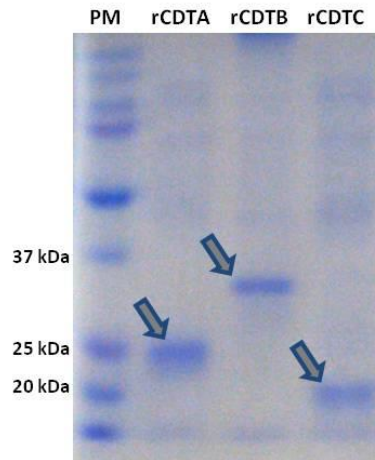


Figura 9 - Fotografia de gel de poliacrilamida a 10% corado com Azul de comassie, onde extratos de proteínas recombinantes rCDTA, rCDTB e rCDTC purificadas foram submetidas à eletroforese.

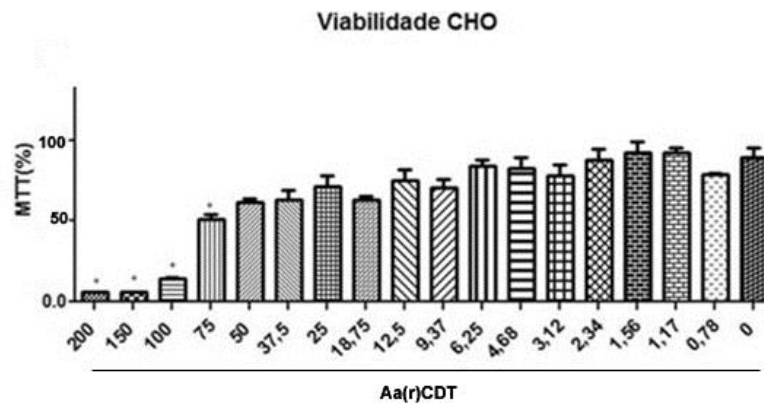


Nota: Em (PM) peso molecular – Precision protein standard, Bio-Rad, EUA. Aas setas indicam a banda correspondente a cada proteína rCDT (rCDTA, rCDTB e rCDTC com massa de 27, 30 e 20 kDa , respectivamente).

4.2 Determinação do efeito da Aa(r)CDT sobre a viabilidade de células CHO 9

Para determinar a atividade Aa(r)CDT da toxina recombinante, as subunidades purificadas foram adicionadas e a toxina reconstituída foi adicionada a células epiteliais murínicas CHO-9. Pode-se observar que a Aa(r)CDT foi capaz de afetar a viabilidade de células CHO-9, visto serem estas comumente utilizadas em ensaios de CDT, devido a sua sensibilidade à toxina. Foi observada diminuição na viabilidade celular a partir da concentração de 75 µg/ml de Aa(r)CDT, como demonstrado na figura 10. Assim para os experimentos seguintes com as células RAW 264.7 ou BMC, foram selecionadas doses subletais de Aa(r)CDT para a observação da sua atividade na diferenciação de osteoclastos.

Figura 10 - Efeito da atividade da adição da Aa(r)CDT em células CHO



Nota. Viabilidade celular detectada por ensaio de MTT (% de viáveis) pela adição da Aa(r)CDT em células CHO em diferentes concentrações (µg/ml). Em 0: células CHO9 sem adição de Aa(r)CDT. Em (*) $p < 0.05$ com diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle negativo (ANOVA-Tukey).

4.3 Análise da indução da diferenciação de osteoclastos em células RAW 264.7 e BMC

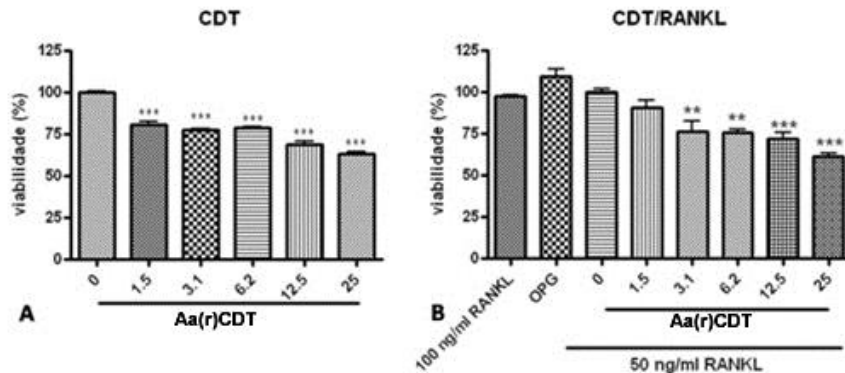
Para determinar a resposta da Aa(r)CDT em células RAW 264.7, foi inicialmente determinada a viabilidade das células submetidas a toxina, na ausência e presença de RANKL. A seguir foi determinada a influência de doses subletais na diferenciação de osteoclastos na presença e ausência de RANKL. Os ensaios utilizando células de medula óssea (BMC) de camundongos C57Bl/6 foram realizados em meio com e sem RANKL, suplementado com a adição de M-CSF com 20 ng/ml em todos os poços.

O M-CSF é uma proteína essencial para o desenvolvimento e sobrevivência, sendo indispensável nos experimentos para a diferenciação de osteoclastos (TAKAYANAGI, 2010).

4.3.1 Análise da viabilidade celular pela adição de Aa(r)CDT de *A. actinomycetemcomitans* em células RAW 264.7 e em BMC

A adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT levou a redução da viabilidade das células RAW 264.7. Esta redução nos ensaios sem RANKL foi entre 19,23% a 37,02% quando diferentes concentrações de Aa(r)CDT foram adicionadas. Nos ensaios com adição de RANKL foi observada redução de 23,35 a 38,75% quando diferentes concentrações de Aa(r)CDT foram adicionadas, como demonstrado nas figuras 11 A e 11 B.

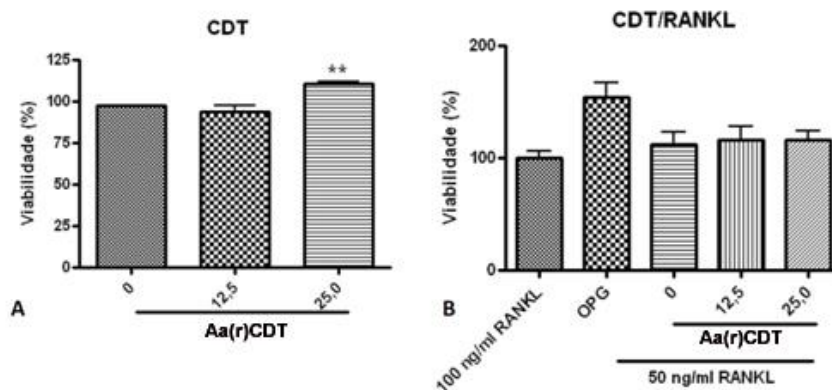
Figura 11 - Porcentagem de células RAW 264.7 viáveis na presença de diferentes concentrações de Aa(r)CDT.



Nota: Em (A) células RAW 264.7 com adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT, em (B) células RAW 264.7 acrescidas de RANKL com adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle negativo (0) (ANOVA-Tukey).

Quando diferentes concentrações de Aa(r)CDT foram adicionadas às BMCs foi observado aumento na viabilidade com adição de 25 µg/ml em relação ao controle (figura 12 A). A adição de CDTABC às células BMC em meio com 50 µg/ml de RANKL não resultou em alteração da viabilidade em relação ao controle (figura 12 B).

Figura 12 - Viabilidade de células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF e as diferentes concentrações de Aa(r)CDT.



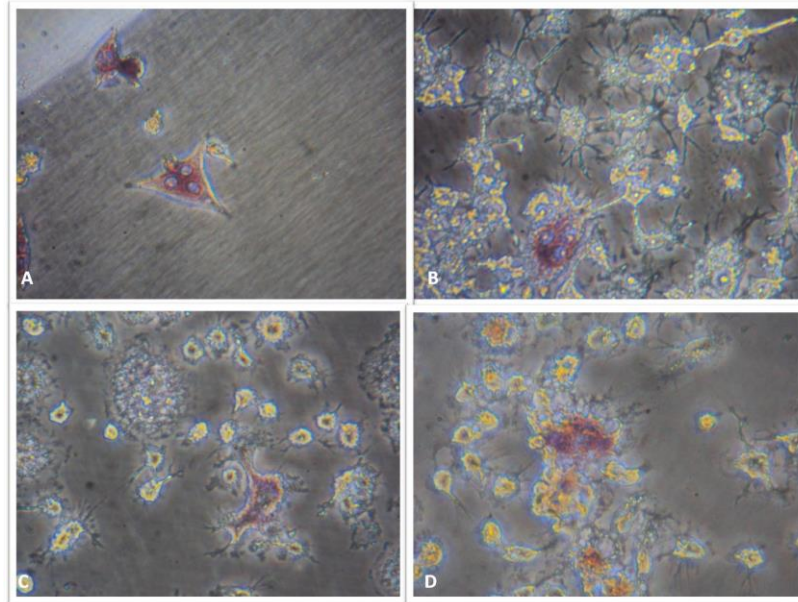
Nota: Em (0) sem adição de Aa(r)CDT; (OPG) controle negativo (células acrescidas de 100 ng/ml OPG); em (A) sem adição de 50 ng/ml RANKL e em (B) com adição de 50 ng/ml RANKL. Em (***) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle negativo (ANOVA-Tukey).

4.3.2 Análise da contagem das células multinucleadas TRAP positivas em células RAW 264.7 e em BMC pela adição de Aa(r)CDT de *A. actinomycetemcomitans*

Foi realizada contagem das células TRAP⁺ multinucleadas como apresentado na figura 13. Em células RAW 264.7 na ausência de RANKL, a adição de Aa(r)CDT na maior concentração 25 µg/ml, resultou em um maior número de células TRAP⁺ multinucleadas do

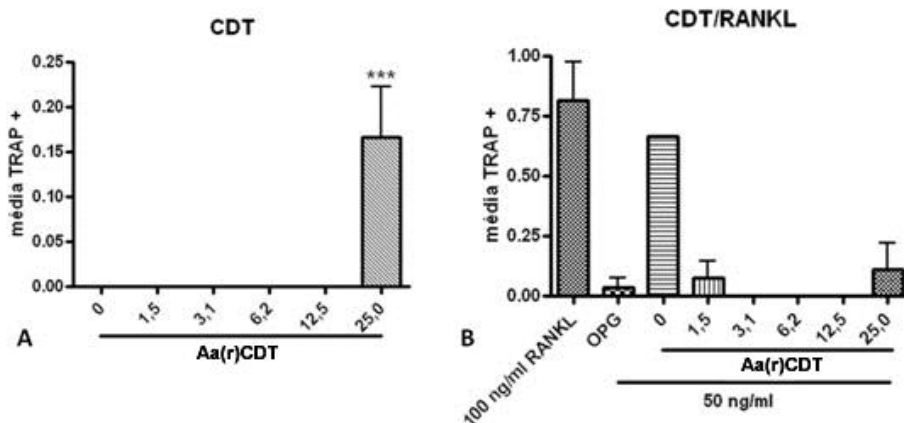
que no controle, como demonstrado na figura 14 A. No entanto, a presença de RANKL, não apresentou alteração na diferenciação de células multinucleadas TRAP+ (figura 14 B).

Figura 13 - Fotografia representativa de células multinucleada TRAP + de células RAW 264.7



Nota: Fotos representativas de células TRAP +. Em (A) células RAW 264.7 acrescida de 1 µg/ml de Aa(r)CDT; em (B) células RAW264.7 acrescida de 1µg/ml de Aa(r)CDT e RANKL; em (C) células de medula óssea murínica acrescida de 12,5 µg/ml de Aa(r)CDT e em (D) células de medula óssea murínica acrescida de 12,5 µg/ml de Aa(r)CDT e RANKL (aumento de 40X).

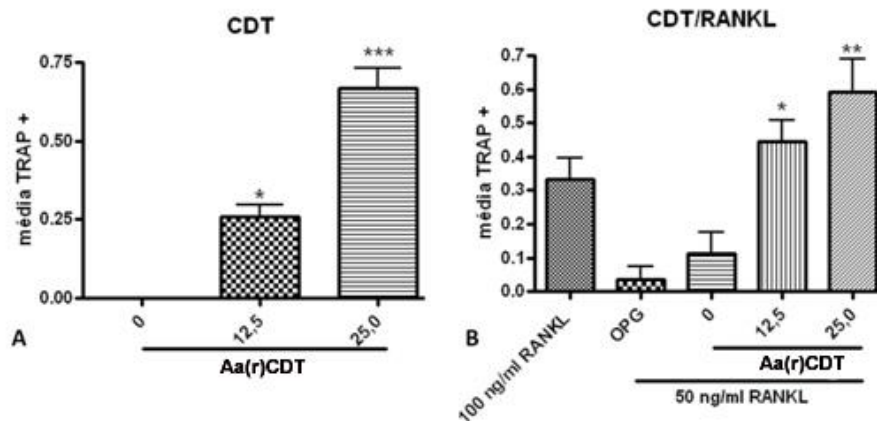
Figura 14 - Número de células osteoclásticas (TRAP+ e multinucleadas) por poço após a adição de diferentes concentrações de Aa(r)CDT em células RAW 264.7.



Nota: Em (A) células RAW 264.7 com adição das concentrações de Aa(r)CDT. Em (B) células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (***) $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle negativo (ANOVA-Tukey).

Em BMC, a adição de Aa(r)CDT nas das concentrações analisadas, induziu a uma maior diferenciação celular, tanto na ausências como na presença de RANKL, evidenciada pelo número de células multinucleadas TRAP + (figura 15 A E 15 B).

Figura 15 - Média da contagem de células multinucleadas TRAP + de BMC acrescidas das diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL.



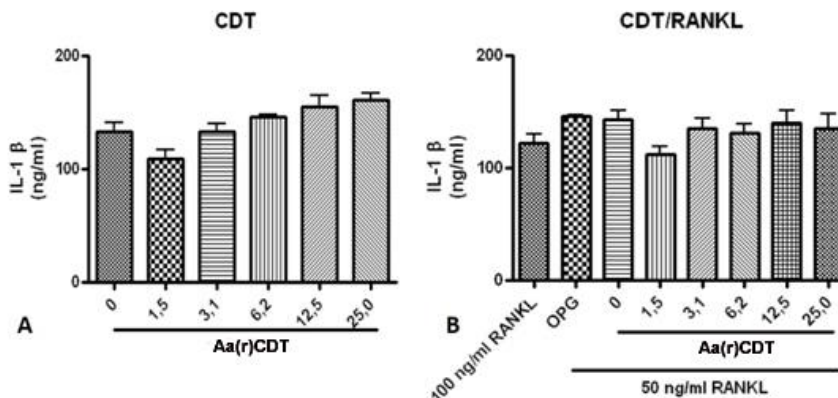
Nota: Em (0) sem adição de Aa(r)CDT; (OPG) células acrescidas de 100 ng/ml de OPG; em (A) sem adição de 50 ng/ml de RANKL e em (B) com adição de 50 ng/ml de RANKL. Em (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA-Tukey).

4.4 Análise dos níveis de citocinas produzidas por células RAW 264.7 e BMC na presença e ausência de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT

4.4.1 Análise de níveis de IL-1 β produzidos por células RAW 264.7 e BMC

A adição de Aa(r)CDT tanto na ausência como na presença de RANKL não apresentou diferença na produção de IL-1 β em nenhuma das concentrações adicionadas em relação aos respectivos controles (figura 16 A e B).

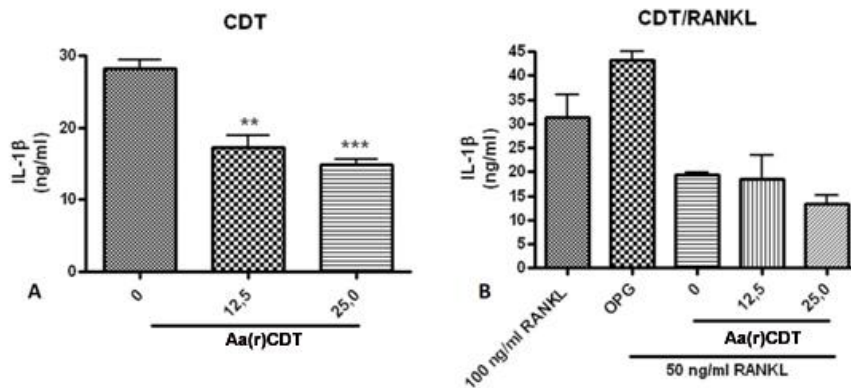
Figura 16 - Análise da produção de IL-1 β no sobrenadante de células RAW 264.7 após 6 dias de incubação.



Nota: Em (A), células RAW 264.7 com adição das concentrações de Aa(r)CDT. Em (B), células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. (ANOVA-Tukey).

Após 6 dias de incubação com Aa(r)CDT, foi observado que as células de medula óssea murínica produziram baixas quantidades de IL-1 β quando foram adicionadas as concentrações de Aa(r)CDT às células na ausência de RANKL (figura 17 A) e na presença de RANKL, não houve alteração na produção desta citocina (figura 17 B).

Figura 17 - Níveis de IL-1 β produzidas por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de 20 ng/ml de M-CSF após incubação por 6 dias.

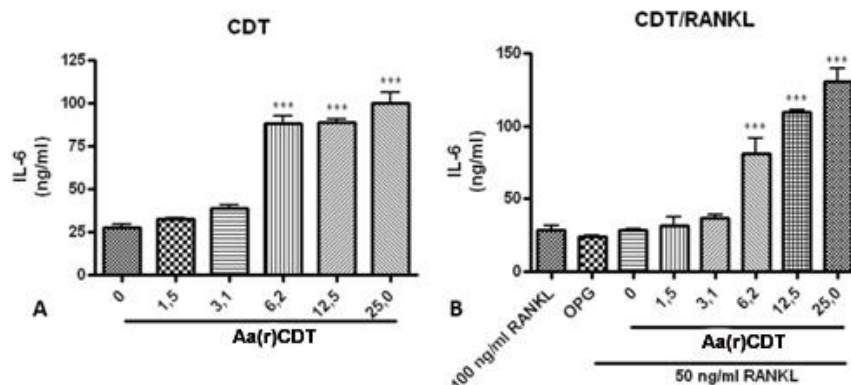


Nota: Em (A) sem adição de RANKL e em (B) com adição de 50 ng/ml de RANKL acrescidas das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (0) células sem adição de Aa(r)CDT; controle OPG - células acrescidas de 100 ng/ml de OPG; em ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA-Tukey).

4.4.2 Análise de níveis de IL-6 produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT

A adição somente de Aa(r)CDT em células RAW 264.7 resultou em aumento da produção de IL-6 nas maiores concentrações tanto na ausência como na presença de RANKL, como demonstrado na figura 18 A e B.

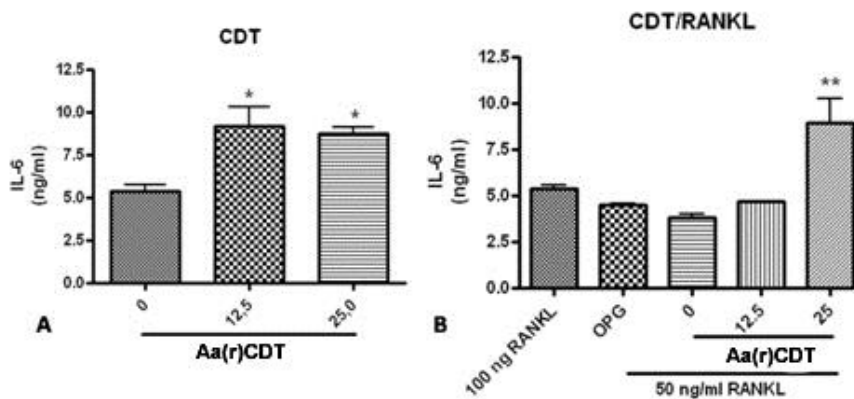
Figura 18 - Análise da produção de IL-6 no sobrenadante de células RAW 264.7 após 6 dias de incubação.



Nota: Em (A), células RAW 264.7 com adição das concentrações de Aa(r)CDT. Em (B), células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (***) $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle 0 (ANOVA-Tukey).

As células de medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidas às maiores concentrações de Aa(r)CDT (25 µg/ml) produziram maiores quantidades de IL-6 na ausência e na presença de RANKL em relação ao controle como demonstrado na figura 19 A e B respectivamente.

Figura 19 - Níveis de IL-6 produzidas por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF após incubação por 6 dias.

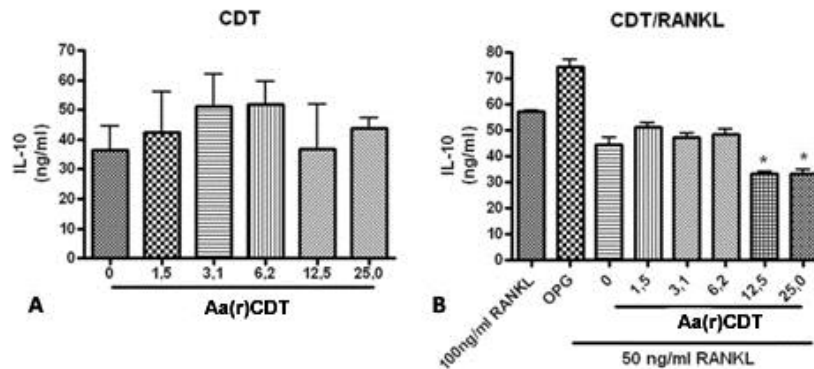


Nota: Sem adição de RANKL (A) e com adição de RANKL (B) acrescidas das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle 0 (ANOVA-Tukey).

4.4.3 Análise dos níveis de IL-10 produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT

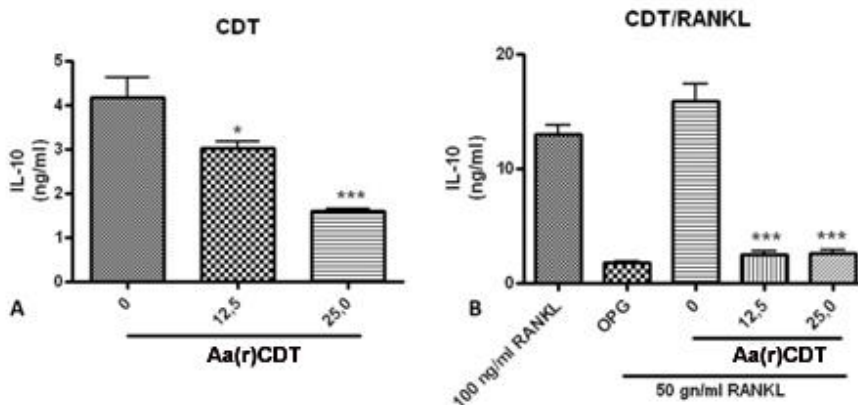
Não foi detectado a diferença na produção de IL-10 por células RAW 264.7 após a adição de Aa(r)CDT na ausência de RANKL (figura 20 A) e na presença de RANKL foi observado uma diminuição da produção de IL-10 quando as maiores concentrações de Aa(r)CDT (12,5 e 25 µg/ml foram adicionadas (figura 20 B). No entanto, em BMC foi observado uma diminuição estatisticamente significativa na produção de IL-10 após os 6 dias de incubação com 25 µg/ml de Aa(r)CDT na ausência e na presença de RANKL, quando 12,5 e 25 µg/ml de Aa(r)CDT foram adicionadas como demonstrado na figura 21 A e 21 B respectivamente.

Figura 20 - Análise da produção de IL-10 no sobrenadante após 6 dias de incubação.



Nota: Em (A), células RAW 264.7 com adição das concentrações de Aa(r)CDT. Em (B), células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (*) $p < 0,05$; $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle (ANOVA-Tukey).

Figura 21 - Níveis de IL-10 produzidos por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF após incubação por 6 dias.

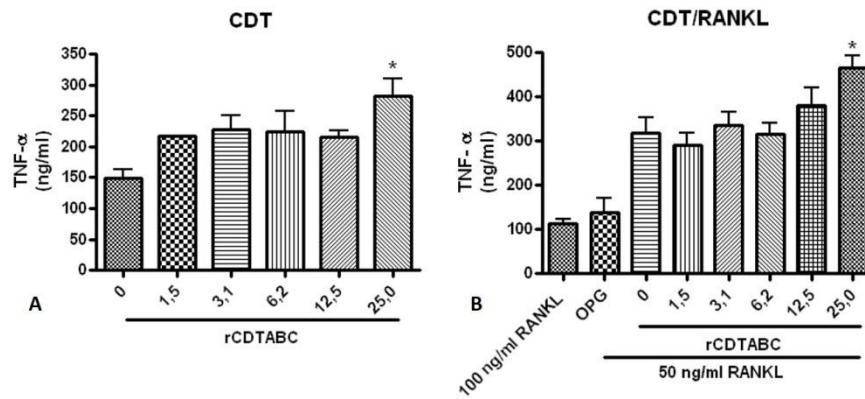


Nota: sem adição de RANKL (A) e com adição de 50 ng/ml de RANKL (B) e diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (OPG) controle negativo com a adição de 100 ng/ml de OPG. Em (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle (0) (ANOVA-Tukey).

4.4.4 Análise dos níveis de TNF- α produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT

Foi observado um aumento estatisticamente significativo na produção de TNF- α no sobrenadante de células RAW 264.7 quando as maiores concentrações de Aa(r)CDT foram adicionadas, tanto na presença como na ausência de RANKL como demonstrado na figura 22 A e B.

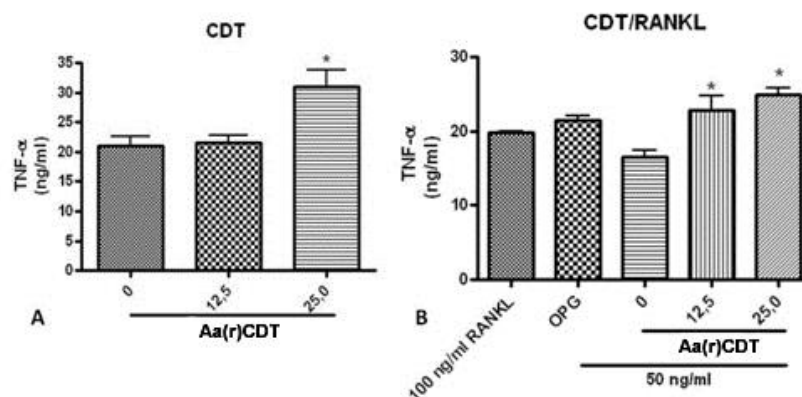
Figura 22 - Análise da produção de TNF- α no sobrenadante de células RAW 264.7 após 6 dias de incubação.



Nota: Em (A), células RAW 264.7 com adição das concentrações de Aa(r)CDT. Em (B), células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (*) $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significante quando comparado com o controle (0) (ANOVA-Tukey).

A adição de Aa(r)CDT à BMC de C57Bl/6 promoveu aumento nos níveis de TNF- α , tanto na ausência como na presença de RANKL quando altas concentrações de Aa(r)CDT são adicionadas às células (figuras 23 A e B).

Figura 23 - Níveis de TNF- α no sobrenadante produzidos por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF após incubação por 6 dias.

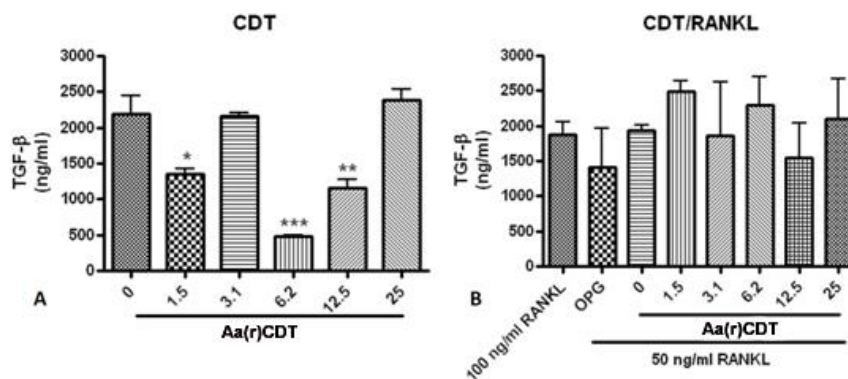


Nota: sem adição de RANKL (A) e com adição de RANKL (B) e diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (OPG) controle negativo com a adição de 100 ng/ml de OPG. Em (*) $p < 0,05$ - diferença estatisticamente significante quando comparado com o controle (0) (ANOVA-Tukey).

4.4.5 Análise dos níveis de TGF- β produzidos por RAW 264.7 e BMC na ausência e presença de RANKL frente às diferentes concentrações de Aa(r)CDT

Na análise da produção de TGF- β , foi observado uma diminuição da produção da citocina somente quando 1,5; 6,2 e 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de Aa(r)CDT foram adicionados às células RAW 264.7 como demonstrado na figura 24 A e a presença da RANKL não alterou a produção desta citocina (figura 24 B).

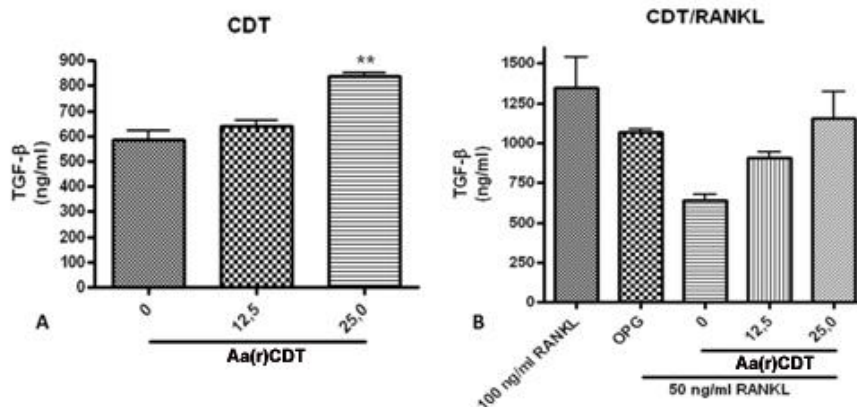
Figura 24 - Análise da produção de TGF- β no sobrenadante de células RAW 264.7 após 6 dias de incubação.



Nota: Em (A), células RAW 264.7 com adição das concentrações de Aa(r)CDT. Em (B), células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ - diferença estatisticamente significante quando comparado com controle negativo (ANOVA-Tukey).

Diferente das células RAW 264.7, em BMC houve um aumento na produção de TGF- β quando a maior 25 $\mu\text{g/ml}$ de Aa(r)CDT foram adicionadas à células (figura 25 A) e na presença de RANKL não houve alteração na produção desta citocina demonstrado na figura 25 B.

Figura 25 - Níveis de TGF- β no sobrenadante produzidos por células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de M-CSF após incubação por 6 dias.



Nota: sem adição de RANKL (A) e com adição de RANKL (B) e diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Em (OPG) controle negativo com a adição de 100 ng/ml de OPG. ** $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle negativo (ANOVA-Tukey).

4.5 Expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese na ausência e presença de RANKL frente Aa(r)CDT.

4.5.1 Teste da eficiência da amplificação

Para validar a eficiência das reações, a partir dos valores do CT foram geradas as equações de regressão listadas na tabela 1. Foram obtidas condições adequadas de amplificação (valores de inclinação entre 2,8 e 3,3) e correlação positiva entre as variáveis maior que 0,95 (R^2 entre 0,97 e 0,99).

Tabela 1 - Equação de regressão e R-quadrado (R^2) das reações de amplificação de cada gene alvo

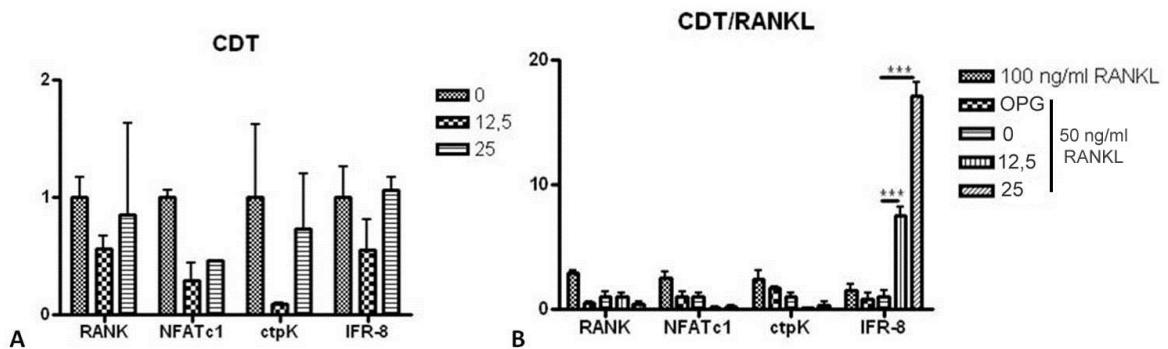
Gene	Equação de Regressão	R^2
ctpK	$y = -104,11x + 3470,2$	0,9964
GAPDH	$y = -93,795x + 2577,4$	0,9961
IFR-8	$y = -81,436x + 2990,5$	0,977
NFATc-1	$y = -102,22x + 3869,9$	0,9975
RANK	$y = -97,97x + 3676,2$	0,999

4.5.2 Análise da quantificação da transcrição gênica de células RAW 264.7 em resposta a Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL

Os resultados da análise da expressão de genes relacionados à osteoclastogênese em células RAW 264.7, inoculadas com as maiores concentrações (25 e 12,5 $\mu\text{g/ml}$) de

Aa(r)CDT, encontram-se apresentados na figura 26 (A e B) e tabelas 2 (sem adição de RANKL) e tabela 3 (com adição de RANKL). Como pode ser observado nas figuras, em nenhuma das condições foi observado regulação positiva dos genes relacionados à osteoclastogênese pela adição de Aa(r)CDT, em relação ao controle sem adição da toxina, com exceção do grupo em que foi adicionada RANKL onde o gene regulador IFR-8, apresentou expressão relativa regulada positivamente pela adição de Aa(r)CDT como demonstrado na figura 26 B.

Figura 26 - Expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese em células RAW 264.7 submetidas a diferentes concentrações de Aa(r)CDT.



Nota: Em (A), células RAW 264.7 sem adição de RANKL. Em (B), células RAW 264.7 acrescidas de 50 ng/ml de RANKL. *** $P < 0,001$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA dois fatores - Bonferroni).

Tabela 2 - Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células RAW 264.7 após a inoculação de Aa(r)CDT, em relação à condição controle, sem adição de Aa(r)CDT.

Gene	Número de vezes		
	Controle	Aa(r)CDT	
		12,5 µg/ml	25 µg/ml
RANK	1	0,557	0,8467
NFATc-1	1	0,554	0,4573
CtpK	1	0,2949	0,7328
IFR-8	1	0,08885	1,058

Nota: Análise estatística utilizando o teste ANOVA dois fatores seguido do pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$). Em (Controle) células com adição de 50 ng/ml de RANKL e sem a adição de Aa(r)CDT.

Tabela 3 - Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células RAW 264.7 submetidas a 50 ng/ml RANKL e inoculação de Aa(r)CDT, em relação a condição controle, sem adição de Aa(r)CDT.

Gene	Quantidade de expressão				
	100ng/ml de		Controle	Aa(r)CDT	
	RANKL			12,5 µg/ml	25 µg/ml
	Gene	OPG	OPG		
RANK	2,897*	0,5334	1	1,038	0,4223
NFATc-1	2,471	1,030	1	0,1412	0,2584
CtpK	2,401	1,684	1	0,07176	0,3065
IFR-8	1,502	0,8038	1	7,481***	17,12***

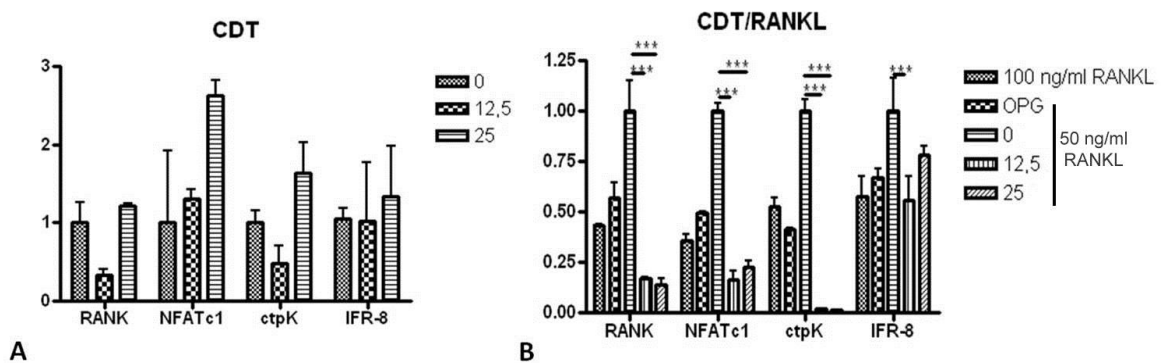
Nota: Análise estatística utilizando o teste ANOVA dois fatores seguido do pós-teste Bonferroni em *p < 0,05 e *** P < 0,001 - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle. Em (Controle) células com adição de 50 ng/ml de RANKL e sem a adição de Aa(r)CDT

4.5.3 Análise da quantificação da transcrição gênica de células de medula óssea (BMC) de camundongos C57Bl/6 em resposta a Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL

Em células de medula óssea, a adição de Aa(r)CDT não resultou em diferenças na expressão relativa de genes associados a osteoclastogênese em relação ao controle sem adição da toxina, nos ensaios na ausência de RANKL (figura 27 A) e tabela 4.

Por outro lado, na presença de RANKL, foi observada regulação negativa na expressão dos genes avaliados quando a Aa(r)CDT foi adicionada, como pode ser observado na figura 27 B e tabela 5.

Figura 27 - Expressão relativa de genes associados à osteoclastogênese em BMC submetidas a diferentes concentrações de Aa(r)CDT.



Nota: Em (A), células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio de cultura com a adição de Aa(r)CDT. Em (B), células de medula óssea de camundongos C57BL/6 em meio acrescidas de RANKL com a adição de Aa(r)CDT. *p < 0,05 e *** P < 0,001 - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA dois fatores - Bonferroni).

Tabela 4 - Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células de medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidas à Aa(r)CDT, em relação a condição controle, sem adição de Aa(r)CDT. Como controle foram utilizadas células sem a adição de Aa(r)CDT.

Gene	Controle	Número de vezes	
		Aa(r)CDT	
		12,5 µg/ml	25,0 µg/ml
RANK	1	0,557	0,8467
NFATc-1	1	0,554	0,4573
CtpK	1	0,2949	0,7328
IFR-8	1	0,08885	1,058

Nota: Dados da análise estatística utilizando o teste ANOVA dois fatores seguido do pós-teste Bonferroni. Não houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Transcrição relativa de genes relacionados com a diferenciação de osteoclastos em células de medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidas a 50 ng/ml de RANKL e inoculadas com Aa(r)CDT, em relação a condição controle, sem adição de Aa(r)CDT.

Gene	Quantidade de expressão				
	100ng/ml de RANKL		Controle	Aa(r)CDT	
	OPG	12,5 µg/ml		25 µg/ml	
RANK	0,5654	0,4328 ***	1	0,168 ***	0,1364***
NFATc-1	0,6455	0,5024***	1	0,1663 ***	0,2257***
CtpK	0,4726	0,5845***	1	0,01856 ***	0,01395***
IFR-8	0,4226	0,333*	1	0,5589 ***	0,7842

Nota: Dados da análise estatística utilizando o teste ANOVA dois fatores seguido do pós-teste Bonferroni. Para (Controle) células sem a adição de Aa(r)CDT; (OPG) células sem a adição de Aa(r)CDT com adição de 100 ng/ml de OPG, (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$.

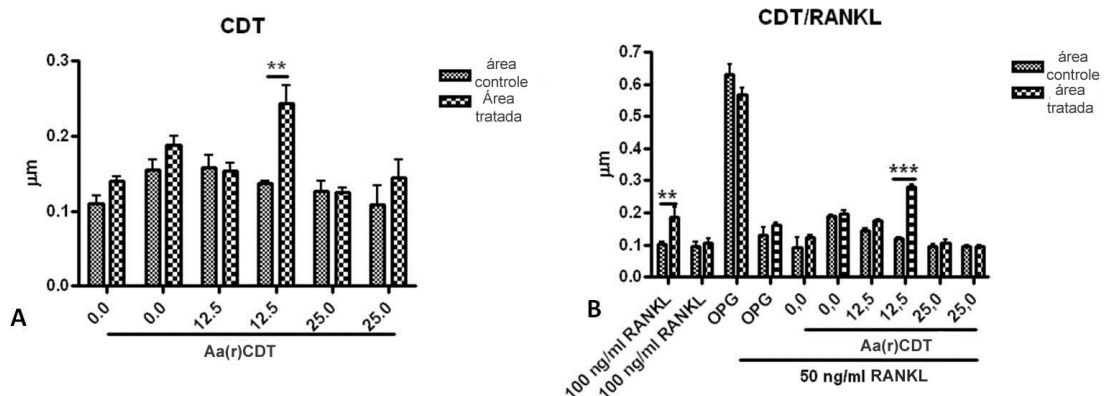
4.6 Determinação da atividade de reabsorção de tecido mineralizado

Foram realizados ensaios com células RAW 264.7 e BMC, onde as células pré-osteoclásticas foram submetidas a diferentes concentrações de Aa(r)CDT, com e sem adição de RANKL, na superfícies de discos de dentina por 3 semanas. As células foram removidas, e os discos de dentina submetidos à análise de rugosidade, como descrito no item 3.2.8. As médias de valores de Ra (média aritmética de rugosidade) e Rmax (valor da maior rugosidade obtida) foram obtidas das áreas controle (onde houve a proteção com o esmalte de unha) e das áreas tratadas (onde houve a exposição da dentina às células submetidas às diferentes condições). Embora os resultados sejam apresentados, estes devem ser interpretados com

cautela, pois o método empregado mostrou-se pouco sensível, não havendo diferença significativa na rugosidade média entre a área controle e a área submetida às células, nos poços de controle positivo. A única exceção foi em um dos discos do ensaio de células RAW 264.7 acrescidas de 100 ng/ml RANKL (figura 28 B). Da mesma maneira, houve diferença significativa entre a área controle e teste em discos relativos aos controles negativos, como em ensaio com BMC com adição de RANKL e osteoprotegerina (figura 30 B, rugosidade média) e com BMCs sem adição de RANKL (figura 31 A, rugosidade máxima).

Os resultados do ensaio com células RAW 264.7 na diferentes condições estão apresentados na figura 28. Foram observadas diferenças na rugosidade inicial entre os discos. Além disso, os valores de rugosidade foram baixos de maneira geral, mesmo no controle positivo com adição de 100 ng/ml de RANKL, e foram observadas diferenças entre ensaios realizados em duplicata. Assim, os dados estão apresentados para cada disco separadamente, e para resultados mais conclusivos há a necessidade de um ensaio com grande número de discos de dentina, e utilizando um equipamento que determine a topografia com maior sensibilidade e não em pontos definidos. O ensaio utilizando células RAW 264.7 sem adição de RANKL revelou aumento da média aritmética da rugosidade (Ra) da área tratada em relação à área controle, em um dos discos de dentina quando 12,5 µg/ml de Aa(r)CDT foram adicionados. Com as mesmas células, na presença de RANKL, foi observado um aumento na Ra em um dos discos na área tratada do ensaio controle positivo (com adição de 100 ng/ml de RANKL). Além disso, também houve diferença da Ra da área controle e tratada no disco referente ao ensaio com 12,5 µg/ml de Aa(r)CDT.

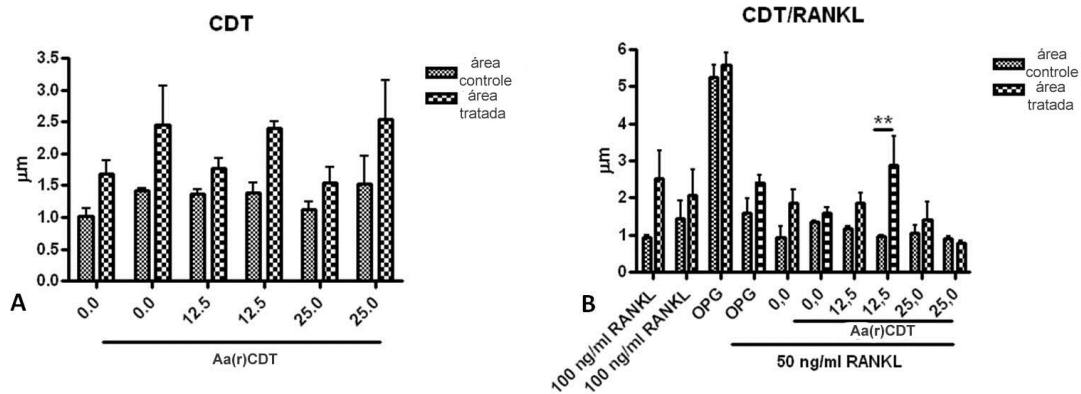
Figura 28 – Representação gráfica da média aritmética de rugosidade (Ra) obtida das quatro leituras em área controle e área exposta às células RAW 264.7, em ensaio com e sem adição de RANKL, e diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Resultados apresentados para cada disco separadamente.



Nota: Em (A) células RAW 264.7 somente com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT em (B) células RAW 264.7 com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT e RANKL 50 ng/ml. Em (OPG) 50 ng/ml de RANKL e 100 ng/ml de osteoprotegerina. (***) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA dois fatores - Bonferroni).

Apesar do aumento de rugosidade média quando 12,5 µg/ml foram adicionados a células RAW 264.7, não houve diferença na rugosidade máxima (Rmax) quando somente a Aa(r)CDT foi adicionada no ensaio sem adição de RANKL (figura 29 A). Por outro lado, na presença de RANKL, quando 12,5 µg/ml Aa(r)CDT foi adicionada, houve diferença significativa na Rmax entre a área controle e tratada no mesmo disco que apresentou um aumento da Ra (figura 29 B). No entanto não houve diferença significativa na Rmax entre a área tratada e controle no disco controle positivo com adição de 100 ng/ml RANKL.

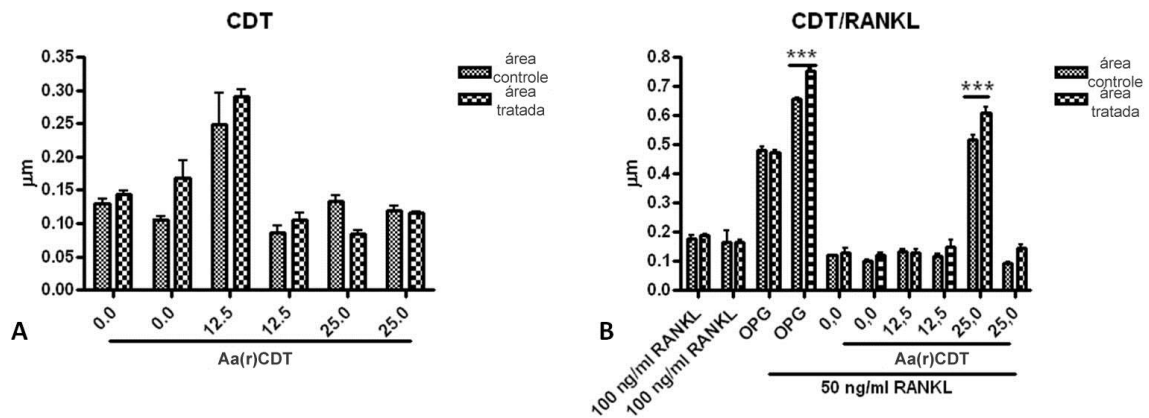
Figura 29 - Representação gráfica da média da Rmax obtida das quatro leituras em áreas de dentina controle em comparação com as leituras obtidas das áreas expostas às células com as diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL.



Nota: Em (A) células RAW 264.7 somente com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT em (B) células RAW 264.7 com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT e RANKL 50 ng/ml. Em (OPG) 50 ng/ml de RANKL e 100 ng/ml de Osteoprotegerina. (**) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA dois fatores - Bonferroni).

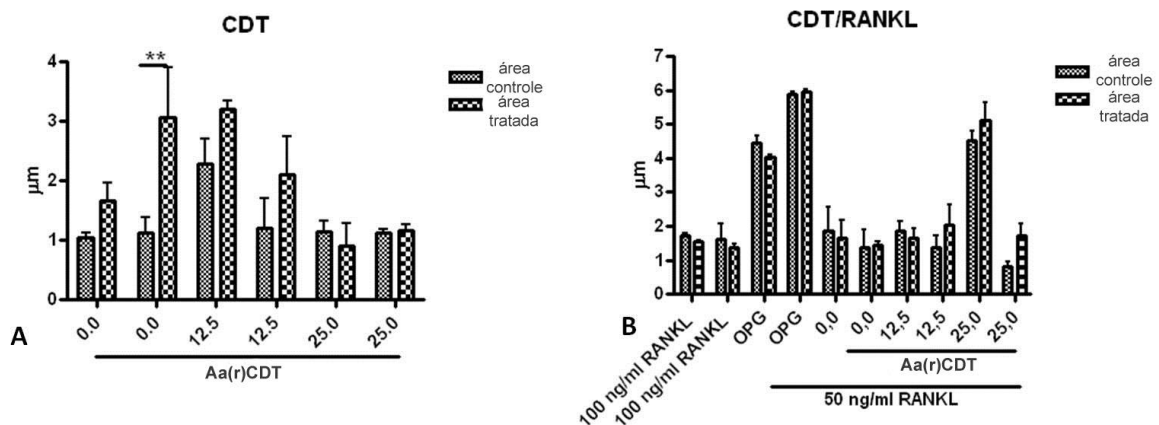
Em células de medula óssea, não houve diferença entre a Ra da área controle e tratada na ausência de RANKL, nas diferentes condições. Na presença de RANKL não houve diferença na Ra no controle positivo, com adição de 100 ng/ml. No entanto, um dos discos com quantidade subótima de RANKL (50 ng/ml) e adição de osteoprotegerina houve diferença entre a Ra da área controle e tratada. Ainda, no mesmo ensaio, foi observada diferença significativa na Ra da área controle e tratada no disco com adição de 25 µg/ml (figura 30 B). Não foi observada diferença significativa na rugosidade máxima (Rmax) entre a área controle e tratado nos ensaios com BMC, com exceção de um disco controle sem adição de Aa(r)CDT (figura 31).

Figura 30 - Representação gráfica da média aritmética de rugosidade (Ra) obtida das quatro leituras em área controle e área exposta às BMC, em ensaio com e sem adição de RANKL, e diferentes concentrações de Aa(r)CDT. Resultados apresentados para cada disco separadamente.



Nota: Em (A) células de medula óssea murínico somente com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT em (B) células de medula óssea murínico com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT e RANKL 50 ng/ml. Em (OPG) 50 ng/ml de RANKL e 100 ng/ml de Osteoprotegerina. (***) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA dois fatores - Bonferroni).

Figura 31 - Representação gráfica da média da Rmax obtida dos discos de dentina das quatro leituras controle em comparação com as leituras obtidas das áreas expostas às células com as diferentes concentrações de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL.



Nota: Em (A) células de medula óssea murínico somente com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT em (B) células de medula óssea murínico com a adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT e RANKL 50 ng/ml. Em (OPG) 50 ng/ml de RANKL e 100 ng/ml de Osteoprotegerina. (***) $p < 0,01$ - diferença estatisticamente significativa quando comparado com controle (ANOVA dois fatores - Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

A. actinomycetemcomitans está associado principalmente à periodontite agressiva que se caracteriza por perda irreversível de osso alveolar e tecidos conectivos no periodonto, resultando em uma perda do elemento dental. A destruição tecidual é resultado da ativação inflamatória de células do hospedeiro como indução da produção de metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e enzimas (GARLET et al., 2004).

Os osteoclastos e osteoblastos funcionam como oponentes para modelar o tecido ósseo sintetizando ou reabsorvendo osso, respectivamente. O desequilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos leva à perda patológica de osso, como ocorre em doenças como periodontite e artrite reumatoide, com excessiva atividade de osteoclastos. Com base em dados de que CDT é produzida por um patógeno periodontal, doença associada a maior atividade osteoclástica, e a demonstração de que células monocíticas são afetadas pela toxina (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014; FERNANDES et al., 2008; MISE et al., 2005), testamos a hipótese de que CDT corroboraria com a perda da homeostase do tecido ósseo, favorecendo a reabsorção óssea, não somente por induzir a expressão de RANKL por fibroblastos (BELIBASAKIS et al., 2005b), mas também por interferir na diferenciação de células hematopoiéticas precursoras de osteoclastos.

No presente estudo foram obtidas subunidades de CDT recombinante e estas formaram a holotoxina. Para a atividade da CDT, todas as subunidades (CDTA, CDTB e CDTC) devem estar presentes na holotoxina, provavelmente na proporção estequiométrica de 1:1:1 (LARA-TEJERO; GALAN, 2001) e a interrupção do ciclo celular não é observada com as subunidades isoladas ou com a combinação de duas unidades. Além disso, as subunidades não se ligam a células alvo quando isoladas (MISE et al., 2005).

Para obtenção de Aa(r)CDT reconstituída foram adicionadas concentrações equivalentes de cada subunidade. A utilização deste protocolo para reconstituição da holotoxina propicia a formação de 60 a 99% de complexos (CAO et al., 2005; 2006). No presente estudo, o complexo trimérico foi separado das subunidades por passagem em filtro de 50 kDa, visto que as subunidades tem massa molecular menor que 30 kDa. Em outros estudos, a remoção das subunidades não complexadas foi realizada por diálise usando um limite de corte de aproximadamente 100 kDa (CAO et al., 2005; 2006). Considera-se que o protocolo utilizando os filtros seja bastante efetivo na eliminação das subunidades, pois a sua passagem é forçada, diferindo da diálise. Além disso, o tempo de trabalho é mais reduzido do que na diálise, evitando a degradação das proteínas.

Para determinar se a holotoxina obtida a partir das subunidades recombinantes purificadas seria ativa, foram realizados ensaios de viabilidade em células CHO, alvos conhecidos de Aa(r)CDT (MAYER et al., 1999). Os dados mostraram que cerca 50% das células CHO perdiam a viabilidade na concentração de 75µg/ml.

CDT induz a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 ou G2/M em uma variedade de células proliferativas, incluindo células epiteliais, fibroblastos do ligamento periodontal e linfócitos (BELIBASAKIS et al., 2004; MISE et al., 2005; OHGUCHI et al., 1998; SHENKER et al., 2001; SMITH; BAYLES, 2006). CDT é uma genotoxina, devido a atividade de DNase de CDTB, causando efeito direto no núcleo das células intoxicadas (ELWELL; DREYFUS, 2000). Assim, os efeitos de parada do ciclo na fase G2 CDT-dependentes nas células intoxicadas foram atribuídos à ativação das vias celulares de reparo do DNA (HASSANE;LEE; PICKETT, 2003; LI et al., 2002). Além disso, CDTB ativa a cascata apoptótica por sua atividade de PI-3,4,5- trifosfato fosfatase (PI3,4,5-P3) (SHENKER et al., 2007) e pode intoxicar células não proliferativas por induzir a fosforilação da histona da família H2A (H2AX) e a re-localização da proteína Mre11 (GARGI et al., 2013).

Aa(r)CDT induz a apoptose em células monocíticas proliferativas e não proliferativas, no entanto, em células proliferativas, a apoptose requer a presença da caspase e da atividade DNase de CDTB, enquanto em células monocíticas U937 não proliferativas diferenciadas, a CDT induz a apoptose por um mecanismo independente de caspase e de fator indutor de apoptose (AIF) e da atividade de fosfatase de PIP₃ (RABIN; FLITTON; DEMUTH, 2009).

Nos ensaios utilizando monócitos/macrófagos de linhagem RAW 264.7 como células precursoras de osteoclastos, os dados mostraram que CDT levou à perda de viabilidade destas células proliferativas, possivelmente por parada do ciclo celular devido a atividade de DNase da CDT, tanto na presença como na ausência de RANKL (figura 11 A e B). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores (BANKS et al., 2007; FERNANDES et al., 2008; MISE et al., 2005; XU et al., 2004) que mostraram que CDT age sobre monócitos / macrófagos. Em estudo realizado neste laboratório (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014) foi demonstrado que a adição de Aa(r)CDT nas concentrações de 6, 12 e 25 µg/ml por 48 horas não afetava de maneira significativa a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 (cerca de 20%). Além disso, no mesmo estudo, não foi detectada apoptose após 48 horas de contato com a toxina. No presente estudo, a perda parcial de viabilidade de células RAW 264.7 após 6 dias na presença e ausência de RANKL (figura 11) poderia ser justificada pelo maior tempo de exposição à toxina.

A perda de viabilidade destas células possivelmente deve-se à parada no ciclo celular, pois o mesmo efeito não foi observado em células não proliferativas. Pelo contrário, Aa(r)CDT pareceu auxiliar na sobrevivência de células mononucleares de medula óssea não submetidas à ação de RANKL (figura 12 A). No entanto, este efeito não foi observado em BMC na presença de RANKL (figura 12 B).

Estes dados sugerem que a viabilidade de células progenitoras de osteoclastos nos tecidos gengivais não seria afetada pela toxina. Ao contrário das células RAW 264.7, e como ocorre em células precursoras de osteoclastos nos tecidos, estas células não se proliferam, portanto, não sofrem parada de ciclo celular. Este fato foi observado para a Aa(r)CDT, o que não quer dizer que é válido para as CDTs produzidas por outros organismos. Isto porque CDTs de diferentes agentes tem ação diferenciada na dependência de glicanas e colesterol de membrana das células do hospedeiro, indicando que o tipo celular alvo não é conservado entre as CDTs produzidas por diferentes espécies bacterianas (ESHRAHGI et al., 2010).

Com base nestes dados iniciais, o presente estudo visou determinar se a Aa(r)CDT influenciaria a diferenciação de osteoclastos, agindo como fator co-estimulatório à ativação promovida por RANKL, ou mesmo na sua ausência. Para induzir a osteoclastogênese as células RAW 264.7 e BMC foram estimuladas com 50 ng/ml de RANKL murínica solúvel (AXMANN et al., 2009; MAKIHIRA et al., 2011), enquanto as células de medula receberam também M-CSF (20 ng/ml) (MAKIHIRA et al., 2011).

A técnica da coloração de células resistentes ao tartrato é uma técnica que aumenta a acurácia para a contagem de células multinucleadas, permitindo a distinção entre osteoclastos e macrófagos ou células mononucleares (BOYDE; JONES, 1991). Foi observado maior número de células multinucleadas TRAP + após adição de Aa(r)CDT nos diferentes ensaios. No entanto, foi evidente também o grande número de células sugestivas de células dendríticas após ação de CDT, tanto nas células RAW 264.7 como nas células de medula óssea. Trabalhos relatam a diferenciação em células dendríticas de células RAW 264.7 após a adição de LPS (SAXENA; VALLYATHAN; LEWIS, 2003). Assim, serão necessários mais estudos, como a análise da expressão de receptores para células dendríticas e osteoclastos, para a confirmação de que CDT favoreceria a diferenciação de células dendríticas. Não pode ser descartada, no entanto, a hipótese de que LPS de *E. coli* poderia estar contaminando a toxina, mesmo após a sua purificação.

Células monocíticas de linhagem como RAW 264.7 ou células de medula óssea podem sofrer diferenciação em osteoclastos (células gigantes, multinucleadas produtoras de fosfatase,

TRAP +). Os dados aqui apresentados mostram que Aa(r)CDT afeta a diferenciação e função das células precursoras de osteoclastos sobreviventes. O tratamento de células RAW 264.7 somente com a toxina resultou em maior número de células multinucleadas TRAP+, sugestivas de osteoclastos (figura 14 A). Além disso, em BMCs, a adição de Aa(r)CDT tanto na ausência como na presença de RANKL levou a maior número de células multinucleadas TRAP+, sugerindo que Aa(r)CDT estaria induzindo a diferenciação de osteoclastos (figuras 15 A e B). Esta observação, associada à demonstração de que a adição de Aa(r)CDT resultou em perda de viabilidade de células RAW 264.7, sugere que Aa(r)CDT em doses subletais induz a diferenciação das células precursoras em osteoclastos, mesmo na ausência de RANKL.

Estes dados foram ainda corroborados pela observação de que maior número de células TRAP+ multinucleadas foram detectadas em BMCs tratadas com Aa(r)CDT, na presença e ausência de RANKL (figura 15 A e B), enquanto a viabilidade destas células não foi afetada pela toxina.

Visando elucidar os possíveis mecanismos associados à diferenciação de células precursoras de osteoclastos induzida por Aa(r)CDT, foi determinado o perfil de citocinas secretadas no sobrenadante das células submetidas a doses subletais de Aa(r)CDT.

Estudos anteriores mostraram que Aa(r)CDT induz a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, interferon γ (IFN- γ) (AKIFUSA et al., 2001). Outras citocinas como IL-10, IL-12, mas não fator de necrose tumoral α (TNF- α) foram associadas a Aa(r)CDT em células monocíticas (ANDO-SUGUIMOTO et al., 2014). É conhecido que citocinas podem interferir no processo de diferenciação de osteoclastos (BISHOP;MEYER; PIKE, 2009; LAM et al., 2000) e estas poderiam estar participando do processo de diferenciação que ocorre na presença de CDT.

A diferenciação de osteoclastos é complexa e dependente da interação de várias células do sistema imune, particularmente células T produtoras de RANKL (WYTHE;NICOLAIDOU; HORWOOD, 2014). O processo de diferenciação de osteoclastos depende também de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos como IL-1 β , TNF- α e IL-6, consideradas citocinas osteolíticas, devido ao seu efeito sobre a reabsorção óssea *in vivo* (TAKAYANAGI, 2010). Assim, no presente estudo, foi analisada a produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β por células RAW 264.7 e BMC após a inoculação de Aa(r)CDT na presença e ausência de RANKL.

A Aa(r)CDT parece não interferir na produção de IL-1 β por células RAW 264.7 (figura 16), embora promova redução da produção de IL-1 β por BMC (figura 16). Por outro lado, a

produção de IL-6 foi maior em células RAW 264.7 (figura 18) e BMC (figura 19) na ausência e presença de RANKL. O mesmo foi observado quanto à produção de TNF- α , por células RAW 264.7 e BMC na presença e ausência de RANKL (figuras 22 e 23).

Um aumento estatisticamente significativo da produção de TNF- α foi observado quando 25 μ g/ml de Aa(r)CDT foram adicionados na ausência e presença de RANKL após 6 dias (figura 22). Estes dados corroboram com ANDO-SUGUIMOTO et al. (2014) que observaram aumento na produção de TNF- α após 48 horas de exposição a Aa(r)CDT.

As citocinas IL-1 β e TNF- α apresentam um efeito sinérgico à RANKL aumentando a sinalização pelo seu receptor RANK aumentando assim a resposta celular (KIM et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2000a). TNF- α é uma das mais potentes citocinas osteoclastogênicas produzidas no processo de inflamação, sendo associada com patologias incluindo artrite reumatóide, afrouxamento de implantes ortopédicos, e outras formas de osteólise inflamatória crônicas (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

A IL-6 possui funções pleiotrópicas em vários tipos celulares, como células T, B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, mesangiais e tumorais (NAKA;NISHIMOTO; KISHIMOTO, 2002). No entanto, a diferenciação de osteoclastos induzida por IL-6 é ainda controversa. Apesar da adição de anticorpo anti IL-6R (receptor de IL-6) resultar em bloqueio da formação de osteoclastos (AXMANN et al., 2009), outros estudos revelam que IL-6 pode suprimir a reabsorção óssea inibindo a diferenciação de precursores osteoclásticos, pela supressão de I κ B (um inibidor específico da via NF- κ B) por degradação. Esta atividade de inibição e estímulo de precursores osteoclásticos resultaria em uma supressão da reabsorção óssea que ocorreria após o estágio de proliferação, sugerindo que IL-6 atua prevenindo a reabsorção óssea excessiva na remodelação óssea (AXMANN et al., 2009; YOSHITAKE et al., 2008). Assim, o aumento da produção de IL-6 observado (figuras 18 e 19) induzido pela adição de Aa(r)CDT poderia ter diferentes efeitos sobre a diferenciação dos osteoclastos.

Quanto a TGF- β , não foi observado um efeito dose resposta na produção desta citocina com a adição de doses crescentes de Aa(r)CDT em células RAW 264.7 (figura 24). No entanto, em BMC foi observado aumento da produção de TGF Beta com adição de Aa(r)CDT, embora diferenças significantes somente tenham sido observadas nas células sem adição de RANKL (figura 25 A). Células B inibem a formação de osteoclastos e diminuem o tempo de vida de osteoclastos maduros através da secreção da TGF- β , sugerindo que esta citocina pode ser considerada como um fator indutor de apoptose para estas células

(WEITZMANN et al., 2000). Portanto a produção de TGF- β seria um fator negativo à diferenciação de células precursoras de osteoclastos induzida por CDT.

A IL-10 tem papel no controle da imunidade inata celular e se relaciona com a inibição da osteoclastogênese (IVASHKIV et al., 2011; MOHAMED et al., 2007; TAKAYANAGI, 2010; WEI et al., 2005). Nos dados obtidos no presente estudo, as altas concentrações de Aa(r)CDT levaram a diminuição na produção de IL-10 por RAW 264.7 (figura 20) e BMC (figura 21). Nos ensaios com células RAW 264.7 não foi observado o aumento na produção de IL-10 quando somente a Aa(r)CDT foi adicionada (figura 20 A), porém com a presença de RANKL, houve diminuição na produção de IL-10 (figura 20 B). Estes dados são contrários a relatos na literatura em que células monocíticas submetidas à rCDT teriam aumento na expressão de IL-10 (AKIFUSA et al., 2001). No estudo realizado por AKIFUSA e colaboradores foram utilizadas células monocíticas humanas desafiadas com CDT por um período de 20 horas. Estes dados também diferem de dados obtidos neste laboratório em que células de linhagem monocítica foram submetidas a Aa(r)CDT por período de apenas 2 dias, e houve aumento de produção de IL-10. A rCDT, por sua ação de fosfatase semelhante a SHIP, promoveria a inibição da via PI3K, o que resultaria em maiores níveis de IL-10 (HAZEKI; NIGORIKAWA; HAZEKI, 2007; HAZEKI et al., 2011;). Por outro lado, no presente estudo foram utilizadas células murínicas de linhagem e de medula óssea, e a produção de citocinas foi determinada após diferenciação por 6 dias, portanto, mais próximo do que ocorreria nos tecidos colonizados por amostras produtoras de CDT. Possivelmente o aumento de IL-10 após o desafio inicial exerceria um efeito de *feed back*, levando à redução nos níveis de IL-10 observada após 6 dias, necessários para que ocorra a formação de osteoclastos maduros.

Assim, a alteração do perfil de citocinas produzidas concomitantemente à diferenciação de células precursoras de osteoclastos na presença de CDT mostrou alteração nos níveis de citocinas associadas sugere que CDT influencia no processo. A redução de IL-10 e aumento da produção de TNF- α induzidos por CDT são associados com maior osteoclastogênese. Por outro lado, o maior nível de TGF- β influenciaria negativamente na sobrevivência de osteoclastos maduros enquanto IL-6 tem atividade controversa –inibição e estímulo– à osteoclastogênese.

Para que ocorra a osteoclastogênese, o fator transcricional e o fator nuclear c1 ativador de células T (NFATc-1) situado a jusante da via de sinalização de RANK deve ser ativado. A osteoclastogênese é dependente da ativação de NF- κ B, c-Fos e NFATc-1 (YAMASHITA et al., 2007) e regulada negativamente por IFR-8 (HU et al., 2010). A deficiência da produção de IRF-8 aumenta a capacidade osteoclástica, resultando no aumento da expressão de NFATc-1 induzindo a diferenciação de osteoclastos (IVASHKIV et al., 2011). O fator de transcrição

NFATc-1 induz a formação de osteoclastos maduros, caracterizados pela produção de catepsina K (MATSUMOTO et al., 2004), anidrase carbônica II e H^+ - ATPase (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007) DC-STAMP, e TRAP (ZHANG et al., 2014).

Fatores inflamatórios como TNF- α e LPS induzem NFATc-1 e posteriormente mediam a fusão célula - célula pela regulação positiva de DC-STAMP e ATPase (ATP6v0d2), contribuindo com a fusão celular dos osteoclastos mononucleares (KIM et al., 2008).

Apesar das evidências sugerindo que Aa(r)CDT induziria a osteoclastogênese, a análise da transcrição de genes relacionados à osteoclastogênese, não suporta estas observações. A adição de Aa(r)CDT levou a regulação negativa de NFATc-1 após 6 dias de incubação em células RAW 264.7 tanto na ausência quanto na presença de RANKL, embora as diferenças não tenha sido estatisticamente significantes (figura 26). A Aa(r)CDT também não teve nenhuma influência estatisticamente significativa na expressão de outros genes relacionados a osteoclastogênese como RANK e ctpK. No entanto, na presença de RANKL, a Aa(r)CDT interferiu na expressão do regulador de resposta IFR-8, regulando positivamente a sua expressão (tabela 3 figura 26 B).

Em BMC, a toxina também não interferiu na expressão de genes associados à osteoclastogênese na ausência de RANKL (figura 27 A) e a adição da toxina na presença de RANKL levou a regulação negativa de RANK, NFATc-1, ctpK e IFR8 (figura 27 B). Apesar dos genes apresentarem uma regulação negativa em relação ao controle, foi observado que o gene IFR-8 foi mais expresso em relação à NFATc-1 (figura 27 B e tabela 5). E esta inibição de NFATc-1 estaria desencadeando também a inibição da expressão do gene catepsina K. A catepsina K é uma cisteína protease secretada pelo osteoclastos na zona clara e está relacionada diretamente com a capacidade de reabsorção óssea (COSTA et al., 2011).

Em BMC após indução da diferenciação com RANKL, NFATc-1 é expresso no citoplasma após 24 horas mas a translocação nuclear é mais evidente após 48 horas, momento em que a fusão celular característica dos osteoclastos se inicia, podendo se observar as células TRAP + e 72 horas após o estímulo com a RANKL, as células multinucleadas alcançam o máximo de expressão de TRAP e NFATc-1 (TAKAYANAGI et al., 2002).

No presente estudo, observou-se uma menor expressão dos genes relacionados à osteoclastogênese quando BMCs foram estimuladas com 100 ng/ml de RANKL quando comparado ao controle onde foi feito o estímulo com 50 ng/ml de RANKL (figura 27 B). Assim, é possível que de maneira similar ao que ocorreu com a adição da maior dose de RANKL, a fase de osteoclastogênese definida pela ativação destes genes já tenha sido ultrapassada, havendo a necessidade de uma nova análise em período de incubação menor

para determinar o real efeito sobre a expressão de genes associados à osteoclastogênese induzida por menores doses de RANKL (50ng/ml) associada à Aa(r)CDT.

No presente estudo, foram considerados como osteoclastos na contagem de células TRAP + multinucleadas aquelas células com mais de três núcleos (AXMANN et al., 2009). Outros estudos mostraram que nas mesmas condições desenvolvidas no presente estudo, usando células RAW 264.7, as primeiras células multinucleadas TRAP + contendo 3 a 4 núcleos aparecem entre o segundo e quarto dia de cultura (MAKIHIRA et al., 2011). A expressão máxima de Na^+/K^+ - ATPase $\alpha 1$ and $\beta 2$ mRNA foi observada no mesmo prazo, enquanto o marcador de osteoclastos maduros (cathepsina K) foi detectado no quinto dia.

No presente estudo, não foi realizada análise da expressão ao longo do tempo, mas os níveis de expressão foram observados apenas no sexto dia, quando possivelmente outros genes estariam sendo regulados positivamente no controle. Esta observação é corroborada pela constatação que a adição de 100 ng/ml de RANKL induziu a menor expressão de ctpK no sexto dia do que a adição de 50 ng/ml.

Outras duas vias de sinalização da diferenciação dos osteoclastos são: a que liga o M-CSF e o seu receptor M-CSFR que ativa a proliferação e sobrevivência de seus precursores induzindo a expressão de RANK, e a outra é o sinal co-estimulatório.

São considerados fatores co-estimulatórios à osteoclastogênese os receptores de imunoglobulina associados ao FcR e DAP 12, que distribui na membrana celular os imunoreceptores ativadores baseados em tirosina (ITAM). As ITAMs possuem uma função co-estimulatória para a sinalização da cascata de sinalização RANK – RANKL (KOGA et al., 2004; ZOU et al., 2008) que recrutam SYK (tirosina quinase de baço - *splen tyrosine kinase*), induzindo NFATc-1 via ativação da fosfolipase $C\gamma$. NFATc-1 é parcialmente ativado também por FOS que faz parte da família da proteína AP1 que regula a diferenciação, proliferação e apoptose de vários tipos celulares (REDLICH; SMOLEN, 2012).

Um fator a ser considerado é o número de núcleos e tamanho das células TRAP+ consideradas osteoclastos maduros. Enquanto para certos autores as células podem ser consideradas como osteoclastos aquelas TRAP + com mais de três núcleos (AXMANN et al., 2009), outros consideram maduras as células TRAP + grandes com mais de 10 núcleos (MAKIHIRA et al., 2011). Os dados em células de coelho precursoras de osteoclastos revelaram que 40% das células com mais de 10 núcleos apresentam capacidade de reabsorver osso, enquanto este valor é de apenas 6% para as células com 3 a 9 núcleos (LEES;SABHARWAL; HEERSCHE, 2001). Outros estudos mostraram ainda que os

osteoclastos apresentando mais de 10 núcleos têm maiores potenciais em reabsorver osso do que os osteoclastos menores com menos de 9 núcleos (MAKIHIRA et al., 2011).

A re-análise das placas coradas com TRAP neste estudo revelou número muito baixo de células TRAP+ com mais de 10 núcleos em todos os ensaios, sugerindo que a capacidade de reabsorção de osso seria muito baixa. Estes dados foram confirmados pela análise de reabsorção de dentina, onde poucas áreas tratadas com as células osteoclásticas nas diferentes condições apresentavam reabsorção.

A regulação positiva da expressão do inibidor IFR-8 na presença de Aa(r)CDT sugere que no estágio analisado, apesar de maior número de células TRAP+ com mais de 3 núcleos (indicativo de diferenciação, mas não indicativo de osteoclastos maduros), a maturação de osteoclastos estaria sendo inibida na presença da toxina, corroborando com a observação de indução de produção de TGF- β e de IL-6. No entanto, consideramos necessária a análise de expressão gênica na presença da CDT em intervalos de tempo menores que 6 dias.

A formação de reabsorção ocorre quando um osteoclasto reabsorve uma cavidade discreta debaixo da célula. O processo de atividade osteoclástica se caracteriza por formar rastros de reabsorção na forma de poços ou trilhas, que são geralmente usados para descrever o comportamento de reabsorção osteoclástica. (VAANANEN, 2005). Para determinar se os osteoclastos produzidos na presença de Aa(r)CDT teriam a capacidade de reabsorver tecido ósseo, foram realizados ensaios de cultura celular sobre discos de dentina onde células com as diferentes concentrações de Aa(r)CDT foram cultivadas por 3 semanas.

O uso de dentina é um substrato apropriado para a utilização experimental para a análise da atividade dos osteoclastos e o ensaio mais simples é a contagem de lacunas de reabsorção após a remoção dos osteoclastos, coloração com azul de toluidina e visualização com microscópio de luz transmitida. Uma desvantagem é que esta técnica não mede o volume das lacunas de reabsorção (BOYDE; JONES, 1991). Neste estudo, após experimento cultivando células RAW 264.7 ou BMC na presença e ausência de RANKL com adição das diferentes concentrações de Aa(r)CDT por 3 semanas não foi possível observar as lacunas de reabsorção (dados não demonstrados). Assim, optamos por realizar experimento determinando a rugosidade dos discos de dentina como descrito no item 3.2.7 por comparação da área tratada com a área controle. No entanto, a técnica não mostrou sensibilidade adequada, com grandes diferenças entre os discos testados, e sem diferenças consistentes entre as áreas tratadas e controle nos discos controle positivos e com diferenças nos discos controle negativos. Na metodologia proposta foi determinada a rugosidade em 4 pontos de cada área, e não feito o escaneamento de toda a área submetida a atividade celular. Outras metodologias quantitativas

devem ser testadas para quantificar a absorção de mineral em discos de dentina expostos a atividade de osteoclastos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a Aa(r)CDT estaria colaborando com a alteração da homeostase óssea, favorecendo a diferenciação de pré-osteoclastos a partir de células RAW 264.7 como células de medula óssea de camundongos C57Bl/6 submetidas a baixas concentrações de RANKL. Esta diferenciação deve-se possivelmente a produção de citocinas osteogênicas como e TNF e IL-6.

A análise da transcrição gênica e atividade dos osteoclastos diferenciados não confirmaram esta observação, sugerindo que a Aa(r)CDT induz ao início da diferenciação de monócitos/macrófagos murínicos em pré-osteoclastos, no entanto, não leva à maturação destes osteoclastos para que ocorra a reabsorção óssea.

REFERÊNCIAS*

- AKIFUSA, S.; POOLE, S.; LEWTHWAITE, J.; HENDERSON, B.; NAIR, S. P. "Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis." Infect. Immun., v. **69** n.9, p.5925-5930, 2001.
- ANDO, E. S. **Toxina Distensora Citoletal (CDT): Análise da resposta mune humoral em soros de pacientes com diferentes condições periodontais e seu efeito sobre a atividade macrofágica.** 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ANDO-SUGUIMOTO, E. S.; DA SILVA, M. P.; KAWAMOTO, D.; CHEN, C.; DIRIENZO, J. M.; MAYER, M. P. A. "The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production." Cytokine, v. **66** n.1, p.46-53, 2014.
- ARAGON, V.; CHAO, K.; DREYFUS, L. A. "Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells." Infect. Immun., v. **65** n.9, p.3774-3780, 1997.
- ARMITAGE, G. C. "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." Ann. Periodontol., v. **4** n.1, p.1-6, 1999.
- ARMSTRONG, A. P.; TOMETSKO, M. E.; GLACCUM, M.; SUTHERLAND, C. L.; COSMAN, D.; DOUGALL, W. C. "A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function." J. Biol. Chem., v. **277** n.46, p.44347-44356, 2002.
- ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. "The molecular understanding of osteoclast differentiation." Bone, v. **40** n.2, p.251-264, 2007.
- ASIKAINEN, S.; ALALUUSUA, S.; SAXEN, L. "Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva." J. Periodontol., v. **62** n.3, p.203-206, 1991.
- ASIKAINEN, S.; CHEN, C. "Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*." Periodontol. 2000, v. **20** p.65-81, 1999.
- AXMANN, R.; BOHM, C.; KRONKE, G.; ZWERINA, J.; SMOLEN, J.; SCHETT, G. "Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo." Arthritis Rheum., v. **60** n.9, p.2747-2756, 2009.
- BANKS, K. E.; HUMPHREYS, T. L.; LI, W.; KATZ, B. P.; WILKES, D. S.; SPINOLA, S. M. "*Haemophilus ducreyi* partially activates human myeloid dendritic cells." Infect. Immun., v. **75** n.12, p.5678-5685, 2007.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELIBASAKIS, G.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CLAEISSON, R.; CHEN, C.; ASIKAINEN, S.; KALFAS, S. "Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin." Eur. J. Oral. Sci., v. **110** n.5, p.366-373, 2002.

BELIBASAKIS, G. N.; BRAGE, M.; LAGERGARD, T.; JOHANSSON, A. "Cytolethal distending toxin upregulates RANKL expression in Jurkat T-cells." APMIS, v. **116** n.6, p.499-506, 2008.

BELIBASAKIS, G. N.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; KALFAS, S.; LERNER, U. H. "The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells." Infect. Immun., v. **73** n.1, p.342-351, 2005a.

BELIBASAKIS, G. N.; JOHANSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; LAGERGARD, T.; KALFAS, S.; LERNER, U. H. "Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin." Cytokine, v. **30** n.2, p.56-63, 2005b.

BELIBASAKIS, G. N.; MATTSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; JOHANSSON, A. "Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin." APMIS, v. **112** n.10, p.674-685, 2004.

BIRKEDAL-HANSEN, H. "Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction." J. Periodontal. Res., v. **28** n.6 Pt 2, p.500-510, 1993.

BISHOP, K. A.; MEYER, M. B.; PIKE, J. W. "A novel distal enhancer mediates cytokine induction of mouse RANKL gene expression." Mol. Endocrinol., v. **23** n.12, p.2095-2110, 2009.

BLAIR, H. C.; ATHANASOU, N. A. "Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption." Histol. Histopathol., v. **19** n.1, p.189-199, 2004.

BOYDE, A.; JONES, S. J. "Pitfalls in pit measurement." Calcif. Tissue Int., v. **49** n.2, p.65-70, 1991.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. "Osteoclast differentiation and activation." Nature, v. **423** n.6937, p.337-342, 2003.

BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem., v. **72** p.248-254, 1976.

BUENO, L. C.; MAYER, M. P.A.; DIRIENZO, J. M. "Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure." J. Periodontol., v. **69** n.9, p.998-1007, 1998.

- CAO, L.; BANDELAC, G.; VOLGINA, A.; KOROSTOFF, J.; DIRIENZO, J. M. "Role of aromatic amino acids in receptor binding activity and subunit assembly of the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*." Infect. Immun., v. **76** n.7, p.2812-2821, 2008.
- CAO, L.; VOLGINA, A.; HUANG, C. M.; KOROSTOFF, J.; DIRIENZO, J. M. "Characterization of point mutations in the *cdtA* gene of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Mol. Microbiol., v. **58** n.5, p.1303-1321, 2005.
- CAO, L.; VOLGINA, A.; KOROSTOFF, J.; DIRIENZO, J. M. "Role of intrachain disulfides in the activities of the CdtA and CdtC subunits of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Infect. Immun., v. **74** n.9, p.4990-5002, 2006.
- CHENU, C.; PFEILSCHIFTER, J.; MUNDY, G. R.; ROODMAN, G. D. "Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. **85** n.15, p.5683-5687, 1988.
- CHIEN, C. C.; TAYLOR, N. S.; GE, Z.; SCHAUER, D. B.; YOUNG, V. B.; FOX, J. G. "Identification of *cdtB* homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp." J. Med. Microbiol., v. **49** n.6, p.525-534, 2000.
- CICEK, M.; VRABEL, A.; STURCHIO, C.; PEDERSON, L.; HAWSE, J. R.; SUBRAMANIAM, M.; SPELSBERG, T. C.; OURSLER, M. J. "TGF-beta inducible early gene 1 regulates osteoclast differentiation and survival by mediating the NFATc1, AKT, and MEK/ERK signaling pathways." PLoS One, v. **6** n.3, p.e17522, 2011.
- COPE, L. D. ;LUMBLEY, S.; LATIMER, J. L.; KLESNEY-TAIT, J.; STEVENS, M. K.; JOHNSON, L. S.; PURVEN, M.; MUNSON, R. S. JR.; LAGERGARD, T.; RADOLF, J. D.; HANSEN, E. J. "A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. **94** n.8, p.4056-4061, 1997.
- CORISDEO, S.; GYDA, M.; ZAIDI, M.; MOONGA, B. S.; TROEN, B. R. "New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand." Biochem. Biophys. Res. Commun., v. **285** n.2, p.335-339, 2001.
- CORTELLI, S. C.; FERES, M.; RODRIGUES, A. A.; AQUINO, D. R.; SHIBLI, J. A.; CORTELLI, J. R. "Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis." J. Periodontol., v. **76** n.2, p.204-209, 2005.
- COSTA, A. G.; CUSANO, N. E.; SILVA, B. C.; CREMERS, S.; BILEZIKIAN, J. P. "Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis." Nature Reviews Rheumatol., v. **7** n.8, p.447-456, 2011.
- DAHLEN, G.; MANJI, F.; BAEUM, V.; FEJERSKOV, O. "Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene." J. Clin. Periodontol., v. **19** n.1, p.35-42, 1992.
- ELWELL, C. A.; DREYFUS, L. A. "DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest." Mol. Microbiol., v. **37** n.4, p.952-963, 2000.

ESHKAGHI, A.; MALDONADO-AROCHO, F. J.; GARGI, A.; CARDWELL, M. M.; PROUTY, M. G.; BLANKE, S. R.; BRADLEY, K. A. "Cytotoxic distending toxin family members are differentially affected by alterations in host glycans and membrane cholesterol." J. Biol. Chem., v. **285** n.24, p.18199-18207, 2010.

EVANS, K. E.; FOX, S. W. "Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus." BMC Cell. Biol., v. **8** p.4, 2007.

FABRIS, A. S.; DIRIENZO, J. M.; WIKSTROM, M.; MAYER, M. P. A. "Detection of cytotoxic distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations." Oral Microbiol. Immunol., v. **17** n.4, p.231-238, 2002.

FACCIO, R.; GRANO, M.; COLUCCI, S.; VILLA, A.; GIANNELLI, G.; QUARANTA, V.; ZALLONE, A. "Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts." J. Cell. Sci., v. **115** n.Pt 14, p.2919-2929, 2002.

FERNANDES, K. P.; MAYER, M. P. A.; ANDO, E. S.; ULBRICH, A. G.; AMARENTE-MENDES, J. G.; RUSSO, M. "Inhibition of interferon-gamma-induced nitric oxide production in endotoxin-activated macrophages by cytotoxic distending toxin." Oral Microbiol. Immunol., v. **23** n.5, p.360-366, 2008.

FINE, D. H.; KAPLAN, J. B.; KACHLANY, S. C.; SCHREINER, H. C. "How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases." Periodontol. 2000, v. **42** p.114-157, 2006.

FIVES-TAYLOR, P. M.; MEYER, D. H.; MINTZ, K. P.; BRISSETTE, C. "Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Periodontol. 2000, v. **20** p.136-167, 1999.

FULLER, K.; MURPHY, C.; KIRSTEIN, B.; FOX, S. W.; CHAMBERS, T. J. "TNF alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL." Endocrinology, v. **143** n.3, p.1108-1118, 2002.

GARGI, A.; TAMILSELVAM, B.; POWERS, B.; PROUTY, M. G.; LINCECUM, T.; ESHKAGHI, A.; MALDONADO-AROCHO, F. J.; WILSON, B. A.; BRADLEY, K. A.; BLANKE, S. R. "Cellular interactions of the cytotoxic distending toxins from *Escherichia coli* and *Haemophilus ducreyi*." J. Biol. Chem., v. **288** n.11, p.7492-7505, 2013.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; CAMPANELLI, A. P.; FERREIRA, B. R.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. "The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction." Clin. Exp. Immunol., v. **147** n.1, p.128-138, 2007.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; SILVA, T. A.; FERREIRA, B. R.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. "Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors." Oral Microbiol. Immunol., v. **21** n.1, p.12-20, 2006.

GARLET, G. P.; MARTINS, W., JR.; FONSECA, B. A.; FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. "Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease." J. Clin. Periodontol., v. **31** n.8, p.671-679, 2004.

GEBLINGER, D.; ZINK, C.; SPENCER, N. D.; ADDADI, L.; GEIGER, B. "Effects of surface microtopography on the assembly of the osteoclast resorption apparatus." J. R. Soc. Interface, v. **9** n.72, p.1599-1608, 2012.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. "Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions." J. Oral Microbiol., v. **3**, p. 1-13 2011.

HAGHJOO, E.; GALAN, J. E. "*Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. **101** n.13, p.4614-4619, 2004.

HASSANE, D. C.; LEE, R. B.; PICKETT, C. L. "*Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells." Infect. Immun., v. **71** n.1, p.541-545, 2003.

HAZEKI, K.; KAMETANI, Y.; MURAKAMI, H.; UEHARA, M.; ISHIKAWA, Y.; NIGORIKAWA, K.; TAKASUGA, S.; SASAKI, T.; SEYA, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, O. "Phosphoinositide 3-kinase γ controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages." PLoS One, v. **6** n.10, p.e26836, 2011.

HAZEKI, K.; NIGORIKAWA, K.; HAZEKI, O. "Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity." Biol. Pharm. Bull., v. **30** n.9, p.1617-1623, 2007.

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; MULLER-NEWEN, G.; SCHAPER, F. "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem. J., v. **374** n.Pt 1, p.1-20, 2003.

HENDERSON, B.; NAIR, S. P.; WARD, J. M.; WILSON, M. "Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Annu. Rev. Microbiol., v. **57** p.29-55, 2003.

HERMAN, S.; MULLER, R. B.; KRONKE, G.; ZWERINA, J.; REDLICH, K.; HUEBER, A. J.; GELSE, H.; NEUMANN, E.; MULLER-LADNER, U.; SCHETT, G. "Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum., v. **58** n.10, p.3041-3050, 2008.

HSU, H.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; SOLOVYEV, I.; COLOMBERO, A.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; ELLIOTT, G.; KELLEY, M. J.; SAROSI, I.; WANG, L.; XIA, X. Z.; ELLIOTT, R.; CHIU, L.; BLACK, T.; SCULLY, S.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; SHIMAMOTO, G.; BASS, M. B.; BOYLE, W. J. "Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. **96** n.7, p.3540-3545, 1999.

HU, L.; LIND, T.; SUNDQVIST, A.; JACOBSON, A.; MELHUS, H. "Retinoic acid increases proliferation of human osteoclast progenitors and inhibits RANKL-stimulated osteoclast differentiation by suppressing RANK." PLoS One, v. **5** n.10, p.e13305, 2010.

IVASHKIV, L. B.; ZHAO, B.; PARK-MIN, K. H.; TAKAMI, M. "Feedback inhibition of osteoclastogenesis during inflammation by IL-10, M-CSF receptor shedding, and induction of IRF8." Ann. N. Y. Acad. Sci., v. **1237** p.88-94, 2011.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H. "A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp." Microb. Pathog., v. **4** n.2, p.115-126, 1988a.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H. "A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material." Microb. Pathog., v. **4** n.2, p.103-113, 1988b.

KACHLANY, S. C.; PLANET, P. J.; DESALLE, R.; FINE, D. H.; FIGURSKI, D. H.; KAPLAN, J. B. "*flp-1*, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Mol. Microbiol., v. **40** n.3, p.542-554, 2001.

KAPLAN, J. B.; KOKEGUCHI, S.; MURAYAMA, Y.; FINE, D. H. "Sequence diversity in the major fimbrial subunit gene (*flp-1*) of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Oral Microbiol. Immunol., v. **17** n.6, p.354-359, 2002.

KATO, T.; HONMA, K.; YAMANAKA, A.; MIURA, T.; OKUDA, K. "Heterogeneity in the immune response to serotype b LPS of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in inbred strains of mice." FEMS Immunol. Med. Microbiol., v. **28** n.1, p.67-70, 2000.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; GONCALVES, R. B.; VALVERDE, P.; DIBART, S.; LI, Y. P.; MIRANDA, L. A.; ERNST, C. W.; IZUMI, Y.; TAUBMAN, M. A. "B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease." Am. J. Pathol., v. **169** n.3, p.987-998, 2006.

KIM, J. H.; JIN, H. M.; KIM, K.; SONG, I.; YOUN, B. U.; MATSUO, K.; KIM, N. "The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1." J. Immunol., v. **183** n.3, p.1862-1870, 2009.

KIM, K.; LEE, S. H.; HA KIM, J.; CHOI, Y.; KIM, N. "NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)." Mol. Endocrinol., v. **22** n.1, p.176-185, 2008.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NARAZAKI, M.; TAGA, T. "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood, v. **86** n.4, p.1243-1254, 1995.

KOBAYASHI, H.; NAGASAWA, T.; ARAMAKI, M.; MAHANONDA, R.; ISHIKAWA, I. "Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria." J. Periodontal. Res., v. **35** n.6, p.319-328, 2000a.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. "Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction." J. Exp. Med., v. **191** n.2, p.275-286, 2000b.

KOGA, T.; INUI, M.; INOUE, K.; KIM, S.; SUEMATSU, A.; KOBAYASHI, E.; IWATA, T.; OHNISHI, H.; MATOZAKI, T.; KODAMA, T.; TANIGUCHI, T.; TAKAYANAGI, H.; TAKAI, T. "Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis." Nature, v. **428** n.6984, p.758-763, 2004.

KOLODRUBETZ, D.; DAILEY, T.; EBERSOLE, J.; KRAIG, E. "Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Infect. Immun., v. **57** n.5, p.1465-1469, 1989.

KOLODRUBETZ, D.; SPITZNAGEL, J. JR.; WANG, B.; PHILLIPS, L. H.; JACOBS, C.; KRAIG, E. "cis Elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Infect. Immun., v. **64** n.9, p.3451-3460, 1996.

LACEY, D. L.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C. R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y. X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W. J. "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell, v. **93** n.2, p.165-176, 1998.

LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature, v. **227** n.5259, p.680-685, 1970.

LAKKAKORPI, P. T.; VAANANEN, H. K. "Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro." J. Bone Miner. Res., v. **6** n.8, p.817-826, 1991.

LAM, J.; TAKESHITA, S.; BARKER, J. E.; KANAGAWA, O.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. "TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand." J. Clin. Invest., v. **106** n.12, p.1481-1488, 2000.

LARA-TEJERO, M. "A bacterial toxin that causes DNA damage to modulate cellular responses." ScientificWorldJournal, v. **1** p.190-191, 2001.

LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. "A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein." Science, v. **290** n.5490, p.354-357, 2000.

LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. "CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity." Infect. Immun., v. **69** n.7, p.4358-4365, 2001.

LAU, L.; SANZ, M.; HERRERA, D.; MORILLO, J. M.; MARTIN, C.; SILVA, A. "Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two

methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples." J. Clin. Periodontol., v. **31** n.12, p.1061-1069, 2004.

LEE, B.; KIM, T. H.; JUN, J. B.; YOO, D. H.; WOO, J. H.; CHOI, S. J.; LEE, Y. H.; SONG, G. G.; SOHN, J.; PARK-MIN, K. H.; IVASHKIV, L. B.; JI, J. D. "Direct inhibition of human RANK+ osteoclast precursors identifies a homeostatic function of IL-1beta." J. Immunol., v. **185** n.10, p.5926-5934, 2010.

LEES, R. L.; SABHARWAL, V. K.; HEERSCHKE, J. N. "Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films." Bone, v. **28** n.2, p.187-194, 2001.

LI, L.; SHARIPO, A.; CHAVES-OLARTE, E.; MASUCCI, M. G.; LEVITSKY, V.; THELESTAM, M.; FRISAN, T. "The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells." Cell. Microbiol., v. **4** n.2, p.87-99, 2002.

MAKIHIRA, S.; NIKAWA, H.; KAJIYA, M.; KAWAI, T.; MINE, Y.; KOSAKA, E.; SILVA, M. J.; TOBIUME, K.; TERADA, Y. "Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase- α 1 with ouabain and vanadate suppresses cell-cell fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis." Eur. J.Pharmacol., v. **670** n.2-3, p.409-418, 2011.

MANDELL, R. L.; SOCRANSKY, S. S. "A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis." J. Periodontol., v. **52** n.10, p.593-598, 1981.

MAO, X.; DIRIENZO, J. M. "Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin." Cell. Microbiol., v. **4** n.4, p.245-255, 2002.

MATSUMOTO, M.; KOGAWA, M.; WADA, S.; TAKAYANAGI, H.; TSUJIMOTO, M.; KATAYAMA, S.; HISATAKE, K.; NOGI, Y. "Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1." J. Biol. Chem., v. **279** n.44, p.45969-45979, 2004.

MAYER, M. P. A.; BUENO, L. C.; HANSEN, E. J.; DIRIENZO, J. M. "Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Infect. Immun., v. **67** n.3, p.1227-1237, 1999.

MISE, K.; AKIFUSA, S.; WATARAI, S.; ANSAI, T.; NISHIHARA, T.; TAKEHARA, T. "Involvement of ganglioside GM3 in G(2)/M cell cycle arrest of human monocytic cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin." Infect. Immun., v. **73** n.8, p.4846-4852, 2005.

MIYAZAKI, T.; KATAGIRI, H.; KANEGAE, Y.; TAKAYANAGI, H.; SAWADA, Y.; YAMAMOTO, A.; PANDO, M. P.; ASANO, T.; VERMA, I. M.; ODA, H.; NAKAMURA, K.; TANAKA, S. "Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts." J. Cell. Biol., v. **148** n.2, p.333-342, 2000.

MOHAMED, S. G.; SUGIYAMA, E.; SHINODA, K.; TAKI, H.; HOUNOKI, H.; ABDEL-AZIZ, H. O.; MARUYAMA, M.; KOBAYASHI, M.; OGAWA, H.; MIYAHARA, T. "Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells." Bone, v. **41** n.4, p.592-602, 2007.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. "Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine." Immunol. Rev., v. **226** p.205-218, 2008.

NAGATA, N.; KITaura, H.; YOSHIDA, N.; NAKAYAMA, K. "Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN-gamma possibly induced from non-T cell population." Bone, v. **33** n.4, p.721-732, 2003.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. "The paradigm of IL-6: from basic science to medicine." Arthritis Res., v. **4 Suppl 3** p.S233-242, 2002.

NAKAMURA, I.; PILKINGTON, M. F.; LAKKAKORPI, P. T.; LIPFERT, L.; SIMS, S. M.; DIXON, S. J.; RODAN, G. A.; DUONG, L. T. "Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone." J. Cell. Sci., v. **112 (Pt 22)** p.3985-3993, 1999.

NELSON, N.; KANNO, Y.; HONG, C.; CONTURS, C.; FUJITA, T.; FOWLKES, B. J.; O'CONNELL, E.; HU-LI, J.; PAUL, W. E.; JANKOVIC, D.; SHER, A. F.; COLIGAN, J. E.; THORNTON, A.; APPELLA, E.; YANG, Y.; OZATO, K. "Expression of IFN regulatory factor family proteins in lymphocytes. Induction of Stat-1 and IFN consensus sequence binding protein expression by T cell activation." J. Immunol., v. **156** n.10, p.3711-3720, 1996.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. "Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates." Int. J. Syst. Evol. Microbiol., v. **56** n.Pt 9, p.2135-2146, 2006.

OHGUCHI, M.; ISHISAKI, A.; OKAHASHI, N.; KOIDE, M.; KOSEKI, T.; YAMATO, K.; NOGUCHI, T.; NISHIHARA, T. "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* toxin induces both cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis." Infect. Immun., v. **66** n.12, p.5980-5987, 1998.

OKUDA, J.; FUKUMOTO, M.; TAKEDA, Y.; NISHIBUCHI, M. "Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the cdtABC genes of *Shigella dysenteriae*." Infect. Immun., v. **65** n.2, p.428-433, 1997.

OWENS, J. M.; GALLAGHER, A. C.; CHAMBERS, T. J. "IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures." J. Immunol., v. **157** n.2, p.936-940, 1996.

PABLOS ALVAREZ, J. L. "Interleukin 6 in the physiopathology of rheumatoid arthritis." Reumatol. Clin., v. **5** n.1, p.34-39, 2009.

PAJU, S.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; FIVES-TAYLOR, P.; ASIKAINEN, S. "Characterization of serologically nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates." J. Clin. Microbiol., v. **36** n.7, p.2019-2022, 1998.

PAPAPANOU, P. N. "Epidemiology of periodontal diseases: an update." J. Int. Acad. Periodontol., v. **1** n.4, p.110-116, 1999.

PATUREL, L.; CASALTA, J. P.; HABIB, G.; NEZRI, M.; RAOULT, D. "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis." Clin. Microbiol. Infect., v. **10** n.2, p.98-118, 2004.

PFÄFFL, M. W. "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res., v. **29** n.9, p.e45, 2001.

PICKETT, C. L.; COTTLE, D. L.; PESCI, E. C.; BIKAH, G. "Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes." Infect. Immun., v. **62** n.3, p.1046-1051, 1994.

PICKETT, C. L.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; RUSSELL, G.; ERDEM, A. N.; ZEYDIN, H. "Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. cdtB gene." Infect. Immun., v. **64** n.6, p.2070-2078, 1996.

PICKETT, C. L.; WHITEHOUSE, C. A. "The cytolethal distending toxin family." Trends Microbiol., v. **7** n.7, p.292-297, 1999.

RABIN, S. D.; FLITTON, J. G.; DEMUTH, D. R. "*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism." Infect. Immun., v. **77** n.8, p.3161-3169, 2009.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. "Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention." Nat. Rev. Drug. Discov., v. **11** n.3, p.234-250, 2012.

ROSE, J. E.; MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. "Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells." Infect. Immun., v. **71** n.5, p.2384-2393, 2003.

ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. "alpha v beta 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology." Immunol. Rev., v. **208** p.88-105, 2005.

ROUX, S.; LAMBERT-COMEAU, P.; SAINT-PIERRE, C.; LEPINE, M.; SAWAN, B.; PARENT, J. L. "Death receptors, Fas and TRAIL receptors, are involved in human osteoclast apoptosis." Biochem. Biophys. Res. Commun., v. **333** n.1, p.42-50, 2005.

SAXENA, R. K.; VALLYATHAN, V.; LEWIS, D. M. "Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells." J. Biosci., v. **28** n.1, p.129-134, 2003.

SHENKER, B. J.; BESACK, D.; MCKAY, T.; PANKOSKI, L.; ZEKAVAT, A.; DEMUTH D. R. "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (Cdt): evidence that the holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC." J. Immunol., v. **172** n.1, p.410-417, 2004.

SHENKER, B. J.; DLAKIC, M.; WALKER, L. P.; BESACK, D.; JAFFE, E.; LABELLE, E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. "A novel mode of action for a microbial-derived immunotoxin: the cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase activity." J. Immunol., v. **178** n.8, p.5099-5108, 2007.

SHENKER, B. J.; HOFFMASTER, R. H.; ZEKAVAT, A.; YAMAGUCHI, N.; LALLY, E. T.; DEMUTH, D. R. "Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle." J. Immunol., v. **167** n.1, p.435-441, 2001.

SHENKER, B. J.; MCKAY, T.; DATAR, S.; MILLER, M.; CHOWHAN, R.; DEMUTH, D. "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells." J. Immunol., v. **162** n.8, p.4773-4780, 1999.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LUTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W. J. "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." Cell, v. **89** n.2, p.309-319, 1997.

SLOTS, J. "Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." J. Clin. Microbiol., v. **15** n.4, p.606-609, 1982.

SLOTS, J.; REYNOLDS, H. S.; GENCO, R. J. "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation." Infect Immun, v. **29** n.3, p.1013-1020, 1980.

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. "The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis." Crit. Rev. Microbiol., v. **32** n.4, p.227-248, 2006.

SOLARI, F.; FLAMANT, F.; CHEREL, Y.; WYERS, M.; JURDIC, P. "The osteoclast generation: an in vitro and in vivo study with a genetically labelled avian monocytic cell line." J. Cell. Sci., v. **109** (Pt 6) p.1203-1213, 1996.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J. Cell. Mol. Med., v. **9** n.1, p.59-71, 2005.

SUGAI, M.; KAWAMOTO, T.; PERES, S. Y.; UENO, Y.; KOMATSUZAWA, H.; FUJIWARA, T.; KURIHARA, H.; SUGINAKA, H.; OSWALD, E. "The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin." Infect. Immun., v. **66** n.10, p.5008-5019, 1998.

TAKAYANAGI, H. "New immune connections in osteoclast formation." Ann. N. Y. Acad. Sci., v. **1192** p.117-123, 2010.

TAKAYANAGI, H.; KIM, S.; KOGA, T.; NISHINA, H.; ISSHIKI, M.; YOSHIDA, H.; SAIURA, A.; ISOBE, M.; YOKOCHI, T.; INOUE, J.; WAGNER, E. F.; MAK, T. W.;

KODAMA, T.; TANIGUCHI, T. "Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts." Dev. Cell., v. **3** n.6, p.889-901, 2002.

TANAKA, S.; MIYAZAKI, T.; FUKUDA, A.; AKIYAMA, T.; KADONO, Y.; WAKEYAMA, H.; KONO, S.; HOSHIKAWA, S.; NAKAMURA, M.; OHSHIMA, Y.; HIKITA, A.; NAKAMURA, I.; NAKAMURA, K. "Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast." Ann. N. Y. Acad. Sci., v. **1068** p.180-186, 2006.

TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. "Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption." Crit. Rev. Oral. Biol. Med., v. **12** n.2, p.125-135, 2001.

TEITELBAUM, S. L. "Bone resorption by osteoclasts." Science, v. **289** n.5484, p.1504-1508, 2000.

TENG, Y. T.; NGUYEN, H.; GAO, X.; KONG, Y. Y.; GORCZYNSKI, R. M.; SINGH, B.; ELLEN, R. P.; PENNINGER, J. M. "Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection." J. Clin. Invest., v. **106** n.6, p.R59-67, 2000.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; MATSUZAKI, K.; TSURUKAI, T.; ITOH, K.; NAKAGAWA, N.; YASUDA, H.; GOTO, M.; TSUDA, E.; HIGASHIO, K.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. "Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand." Bone, v. **25** n.5, p.517-523, 1999.

VAANANEN, K. "Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics." Adv. Drug. Deliv. Rev., v. **57** n.7, p.959-971, 2005.

VANDOOREN, B.; MELIS, L.; VEYS, E. M.; TAK, P. P.; BAETEN, D. "In vitro spontaneous osteoclastogenesis of human peripheral blood mononuclear cells is not crucially dependent on T lymphocytes." Arthritis Rheum., v. **60** n.4, p.1020-1025, 2009.

VON TROIL-LINDEN, B.; SAARELA, M.; MATTO, J.; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S. "Source of suspected periodontal pathogens re-emerging after periodontal treatment." J. Clin. Periodontol., v. **23** n.6, p.601-607, 1996.

WEI, S.; KITaura, H.; ZHOU, P.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. "IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis." J. Clin. Invest., v. **115** n.2, p.282-290, 2005.

WEITZMANN, M. N.; CENCI, S.; HAUG, J.; BROWN, C.; DIPERSIO, J.; PACIFICI, R. "B lymphocytes inhibit human osteoclastogenesis by secretion of TGFbeta." J. Cell. Biochem., v. **78** n.2, p.318-324, 2000.

WYTHE, S. E.; NICOLAIDOU, V.; HORWOOD, N. J. "Cells of the immune system orchestrate changes in bone cell function." Calcif. Tissue Int., v. **94** n.1, p.98-111, 2014.

XU, T.; LUNDQVIST, A.; AHMED, H. J.; ERIKSSON, K.; YANG, Y.; LAGERGARD, T. "Interactions of *Haemophilus ducreyi* and purified cytolethal distending toxin with human monocyte-derived dendritic cells, macrophages and CD4⁺ T cells." Microbes Infect., v. **6** n.13, p.1171-1181, 2004.

YAMANO, R.; OHARA, M.; NISHIKUBO, S.; FUJIWARA, T.; KAWAMOTO, T.; UENO, Y.; KOMATSUZAWA, H.; OKUDA, K.; KURIHARA, H.; SUGINAKA, H.; OSWALD, E.; TANNE, K.; SUGAI, M. "Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria." J. Clin. Microbiol., v. **41** n.4, p.1391-1398, 2003.

YAMASHITA, T.; YAO, Z.; LI F.;ZHANG Q.;BADELL I. R.;SCHWARZ E. M.;TAKESHITA S.;WAGNER E. F.;NODA, M.; MATSUO, K.; XING, L.; BOYCE, B. F. "NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1." J. Biol. Chem., v. **282** n.25, p.18245-18253, 2007.

YOSHITAKE, F.; ITOH, S.; NARITA, H.; ISHIHARA, K.; EBISU, S. "Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways." J. Biol. Chem., v. **283** n.17, p.11535-11540, 2008.

ZAMBON, J. J. "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease." J Clin. Periodontol., v. **12** n.1, p.1-20, 1985.

ZHANG, C.; DOU, C.; XU, J.; DONG, S. "DC-STAMP, the Key Fusion-Mediating Molecule in Osteoclastogenesis." J. Cell Physiol., 2014.

ZHAO, B.; TAKAMI, M.; YAMADA, A.; WANG, X.; KOGA, T.; HU, X.; TAMURA, T.; OZATO, K.; CHOI, Y.; IVASHKIV, L. B.; TAKAYANAGI, H.; KAMIJO, R. "Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis." Nat. Med., v. **15** n.9, p.1066-1071, 2009.

ZOU, W.; REEVE, J. L.; LIU, Y.; TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. "DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk." Mol. Cell., v. **31** n.3, p.422-431, 2008.