

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**

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

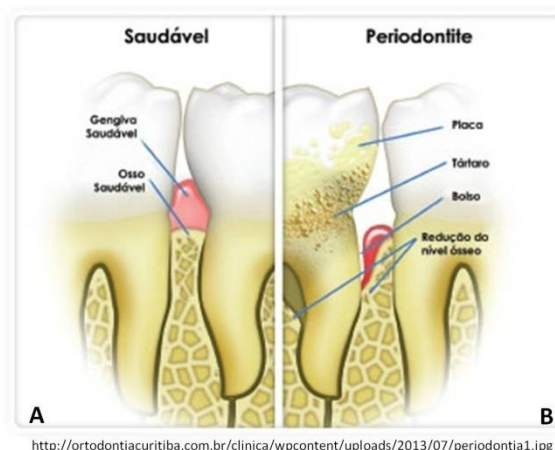
INTRODUÇÃO

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).

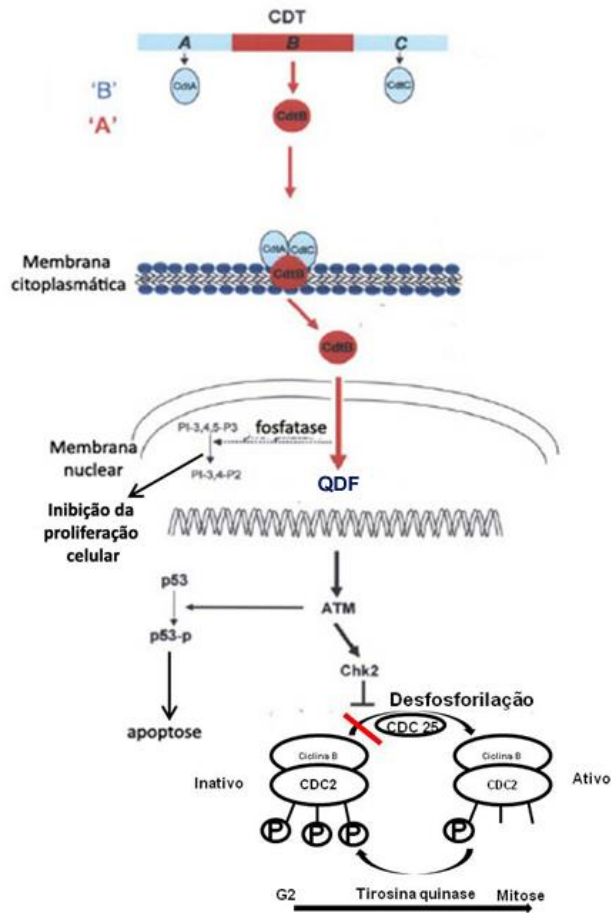
CDT é uma toxina do tipo AB₂, secretada em três subunidades (CDTA, CDTB e CDTC), cada uma com peso molecular entre 25 a 35 kDa (SHENKER et al., 1999). CDTB é a unidade ativa da toxina possuindo atividade DNase I (LARA-TEJERO; GALAN, 2000), enquanto CDTA e CDTC promovem a ligação à célula alvo, levando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

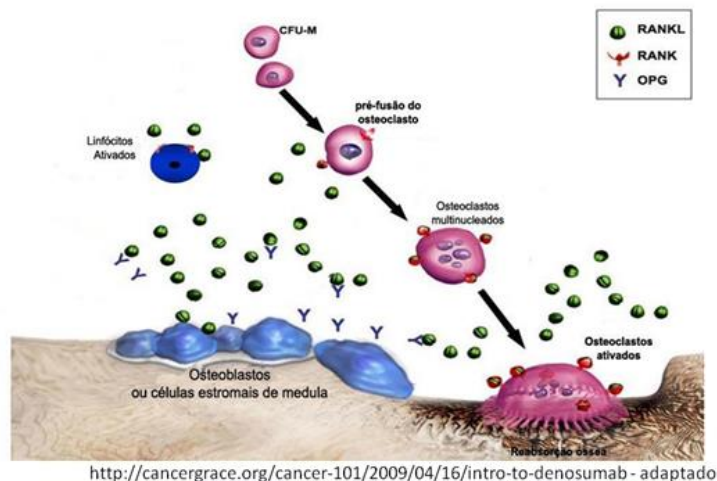
O osso é um tecido que passa por uma contínua remodelação, promovida por processos de reabsorção e neoformação. Inflamações crônicas podem alterar o metabolismo ósseo e promover o aumento da reabsorção óssea. A ativação de várias populações celulares do sistema imune inato e adaptativo, com produção 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

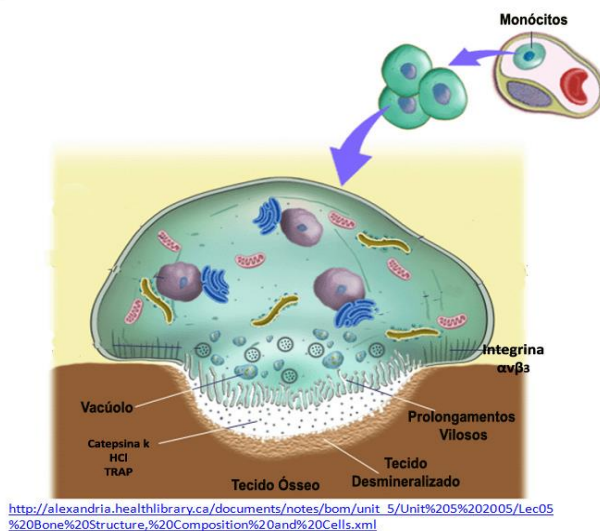


Nota: A osteoclastogênese é dependente da ligação entre RANK, presente na membrana celular de células pré-osteoclásticas (CFU-M) com seu ligante RANKL, produzido por células como os linfócitos e fibroblastos ativados. Esta ligação RANK-RANKL, induz à pré-fusão de osteoclastos levando à coalescência celular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

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 o 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 RANK1 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-AROCHE, 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-AROCHE, 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-NEUEN, 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-alpha1 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.