

MARCELO HENRIQUE NAPIMOGA

Cirurgião Dentista

**“INDUÇÃO DE OSTEOCLASTOGÊNESE INDEPENDENTE DE
RANK POR UMA FRAÇÃO LIPÍDICA ISOLADA DE *Porphyromonas
gingivalis*”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de DOUTOR em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia.

Piracicaba, SP

2005

MARCELO HENRIQUE NAPIMOGA

Cirurgião Dentista

**“INDUÇÃO DE OSTEOCLASTOGÊNESE INDEPENDENTE DE
RANK POR UMA FRAÇÃO LIPÍDICA ISOLADA DE *Porphyromonas
gingivalis*”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de DOUTOR em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador

Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora

Dr. Carlos Amílcar Parada

Dr. Francisco Humberto Nociti Junior

Dr. José Francisco Höfling

Dr. Márcia Pinto Alves Mayer

Piracicaba, SP

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

N162i

Napimoga, Marcelo Henrique.

Indução de osteoclastogenese independente de RANK por uma fração lipídica isolada de *Porphyromonas gingivalis*. / Marcelo Henrique Napimoga. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Reginaldo Bruno Gonçalves.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Osteoclastos. 2. Reabsorção óssea. 3. Doença periodontal. 4. *Porphyromonas gingivalis*. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Osteoclastogenesis induction RANK-independent by a lipid fraction from *Porphyromonas gingivalis*.

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Osteoclasts. 2. Bone resorption. 3. Periodontal diseases. 4. *Porphyromonas gingivalis*.

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora: Reginaldo Bruno Gonçalves; Carlos Amílcar Parada; Francisco Humberto Nociti Júnior; José Francisco Höfling; Márcia Pinto Alves Mayer

Data da defesa: 20/09/2005



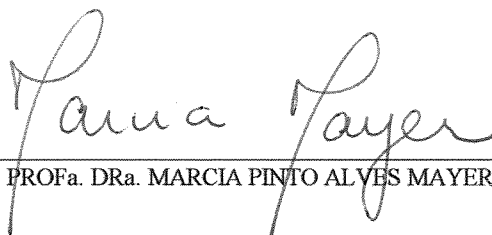
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



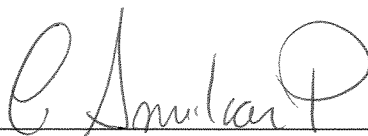
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 20 de Setembro de 2005, considerou o candidato MARCELO HENRIQUE NAPIMOGA aprovado.



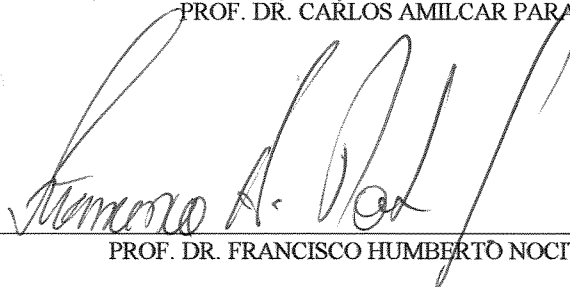
PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES



PROFa. DRa. MARCIA PINTO ALVES MAYER



PROF. DR. CARLOS AMILCAR PARADA



PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR



PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

200601102

Dedicatória

A Deus,

Por sempre iluminar meu caminho e me conceder força para continuar sempre lutando em busca das conquistas de minha vida

Ao meu pai Nestor Napimoga (in memoriam)

Muito obrigado por sempre ter me apoiado e aconselhado, ajudando a trilhar o caminho correto da vida.

A minha mãe Ivone R. Napimoga

Exemplo de dedicação e perseverança. Pela luta incansável e constante em sua vida sempre me apoiando para que eu atinja os objetivos

A minha irmã Camila Napimoga

Pela colaboração e apoio em momentos difíceis

A Juliana Trindade Clemente

Palavras nunca serão suficientes para expressar a intensidade dos meus sentimentos de amor e carinho a esta mulher maravilhosa que sempre esteve ao meu lado! Obrigado pelo apoio, compreensão e amor em todos os momentos de nossas vidas junta. Te amo eternamente!!!

Agradecimento especial

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**,

Durante oito anos foi meu mentor, a quem devo em grande parte o sucesso e concretização de vários projetos pessoais e profissionais.

To Dr. **Toshihisa Kawai**, One of the most brilliant minds that I've ever known are you. I am proud to be his apprentice. You were a good mentor and a good friend as well. Thank you for share your knowledge with me!

Ao Prof. Dr. **José Francisco Höfling**,

Pelo incentivo e por me mostrar como seguir o caminho do ensino

Meus sinceros agradecimentos,

Aos Profs. Dr. **Francisco Carlos Groppo**, do Laboratório de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica Medicamentosa, Dr. **Marcio Cazati**, do Laboratório de Periodontia pelas análises críticas de extrema importância na qualificação desta dissertação,

A Professora Dra. **Márcia Mayer** e aos professores Dr. **José F. Hofling**, **Francisco H. Nociti Júnior** e **Carlos A. Parada** pela colaboração e análise deste trabalho na apresentação da tese de doutorado,

Ao Prof. Dr. **Pedro Luis Rosalen**, coordenador dos cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP e a Prof. Dr. **Paulo Caria**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental,

Aos amigos funcionários da Microbiologia e Imunologia, **Anderson** e **Wilma** pela inestimável ajuda,

Aos amigos e companheiros de pesquisa da Microbiologia **Regianne**, **Rafael**, **Marlise**, **Rita**, **Letícia**, **Daniel**, **Alessandra**, **Ruchele** e **Priscilla**

Aos amigos **Carolina Aires**, **Ramiro**, **Regiane Yatsuda**, **Marcos**, **Giovana Tofoli**, **Filipe**, **Bruno Benatti**, **Marcelo Carvalho**, **João Batista**, **João Moretti**, **Gustavo Passador** pela verdadeira amizade e companheirismo.

Epígrafe

"TRABALHE EM ALGO QUE VOCÊ REALMENTE GOSTE, E
VOCÊ NUNCA PRECISARÁ TRABALHAR NA VIDA"

Nizan Guanaes

SUMÁRIO

RESUMO	p. 1
ABSTRACT	p. 2
1. INTRODUÇÃO	p. 3
2. REVISÃO DA LITERATURA	p. 5
3. PROPOSIÇÃO	p. 13
4. MATERIAL E MÉTODO	p. 14
5. RESULTADOS	p. 24
6. DISCUSSÃO	p. 40
7. CONCLUSÃO	p. 48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 49

RESUMO

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) sintetiza diversas classes de fosfolípidos. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos biológicos que estes lipídeos exercem sobre a reabsorção óssea. Células precursoras de osteoclastos de camundongos, incluindo RAW264.7 e células da medula óssea, foram estimuladas com um lipídeo recém caracterizado isolado de *Pg* (F24), LPS de *Pg*, RANKL e um isômero estrutural isolado de mamíferos (DMPE), seguida de coloração das células por fosfatase ácida (TRAP) para detecção de osteoclastos. A formação de lacunas de reabsorção em discos de dentina foi realizada para identificar a presença de osteoclastos maduros. Proteínas de células precursoras RAW264.7 com afinidade a F24 foram identificadas como sendo nucleolin através de espectrometria de massa, e confirmada sua presença através de ensaio em microscopia confocal. Utilizando Western-blot e RNAi, a sinalização intracelular desencadeada pela F24 durante a osteoclastogênese foi analisada. A F24 mas não o LPS ou DMPE induziu números significativamente maiores de células multinucleadas TRAP+ quando comparado ao RANKL, assim como a formação de lacunas de desmineralização em discos de dentina, o qual não foi inibida pelo repressor do RANKL, a OPG. LPS de *Pg*, mas não a F24, induziu a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelas células RAW264.7. Microscopia confocal mostrou que a F24 está co-localizada com este receptor na superfície de células RAW264.7. A F24 induziu a fosforilação de maior intensidade do p38 e JNK comparado ao RANKL. Este novo fosfolípido isolado de *P. gingivalis*, distinto do LPS, mostrou-se capaz de induzir osteoclastogênese utilizando nucleolin como a molécula receptora através de uma via independente do RANK.

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) synthesizes several classes of complex phospholipids in addition to LPS. However, little is known about the biological effects of these phospholipids on bone resorption. Mouse osteoclast precursor cells including, RAW264.7 and bone marrow cells, were stimulated with phospholipids isolated from *Pg* (F24), *Pg* LPS, RANKL and a mammalian structural isomer (DMPE). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and a dentine-pit formation assay were used for the identification of activated mature osteoclasts. F24's counter-ligand expressed on RAW264.7 cells were identified by affinity purification and mass-spectrometry based proteomics, and counter-examined by a confocal microscopy. Using Western-blot, signaling pathways triggered by F24 during osteoclastogenesis were examined with RNAi technology. F24, but not LPS or DMPE, induced significantly higher number of TRAP+ multinuclear cells from osteoclast precursors than RANKL, along with dentine-pit formation, which was not inhibited by RANKL decoy receptor OPG. *Pg* LPS, but not F24, induced TNF- α , IL-1 β and IL-6 by RAW264.7 cells. Proteomics analyses identified nucleolin as a ligand for F24. Confocal microscopy revealed the co-localization of F24 and its ligand on the surface of RAW264.7 cells. F24 induced stronger phosphorylation of p38 MAP kinase than RANKL. A novel *P. gingivalis* phospholipid that is distinct from LPS represents a new class of RANK-independent osteoclast differentiation factor.

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença que afeta os tecidos de suporte dos dentes, sendo caracterizada por perda de inserção periodontal, incluindo o osso alveolar. A etiologia da doença é multifatorial, sendo que o biofilme microbiano desempenha uma função essencial na etiopatogênese das infecções periodontais (Lamont & Jenkinson, 1998). A cavidade oral humana hospeda grande quantidade e variedade de microrganismos; mais de 500 espécies de diferentes microrganismos já foram isoladas e identificadas. A bactéria anaeróbica *Porphyromonas gingivalis* é reconhecidamente o patógeno de maior importância no desenvolvimento da doença periodontal (Holt *et al.*, 1999) e tem sido extensivamente estudada nos últimos anos.

O lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um dos maiores fatores de virulência desta bactéria, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Esta endotoxina é um antígeno não específico que é pobremente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar a cascata do complemento (Schifferle *et al.*, 1993). A ativação do complemento envolve a formação de cininas, outro importante mediador da inflamação. Também ativa plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. O LPS induz os macrófagos a secretarem interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas. Tem sido relatado que o LPS promove a indução de osteoclastos indiretamente (Nair *et al.*, 1996) através da ativação de receptores do tipo “toll like” 4 (Hou *et al.*, 2000).

Recentes evidências têm demonstrado a presença de diferentes classes de lipídeos complexos sintetizados por *P. gingivalis* em superfícies radiculares contaminadas e bolsas periodontais (Nichols, 1998). O extrato lipídico de *P. gingivalis* mostrou-se capaz de potencializar a secreção de prostaglandina E₂ em cultura de fibroblastos na presença de interleucina-1 β (Nichols *et al.*, 2001). Dentre os lipídeos caracterizados estão os esfingolipídeos (ceramidas) e as fosfo-di-etanolaminas que são distintos dos esfingolípídeos por não possuírem o grupo amida (Nichols *et al.*, 2004; Nichols dados não publicados).

A classe das fosfo-di-etanolaminas foi isolada e caracterizada utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrometria de massa, sendo que,

desta classe foram caracterizados 3 lipídeos conhecidos como fração 17, 24 e 29 devido ao diferente tamanho da cadeia destas frações.

Esta classe de lipídeo recentemente caracterizado, é potencialmente um novo fator de virulência bacteriano que pode estar envolvido na patogênese da doença periodontal. Entretanto, não existem estudos sobre os efeitos das fosfo-di-etanolaminas em células precursoras de osteoclastos e as suas implicações biológicas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento deste lipídeo recém caracterizado, na modulação da ativação de células osteoclásticas além da identificação da via de ativação intracelular utilizada por este lipídeo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cavidade oral alberga uma enorme variedade de microrganismos. Propriedades físicas, químicas e biológicas determinam quais microrganismos estão aptos a colonizar superfícies como o dente ou o periodonto. O biofilme dental é um acúmulo de bactérias, nutrientes, células do hospedeiro e produtos metabólicos em um ambiente especializado conhecido como biofilme (Costerton *et al.*, 1994). Este biofilme está envolto por uma matriz extracelular que fornece vantagens seletivas aos microrganismos que incluem uma grande barreira protetora contra antimicrobianos e agentes fagocíticos da resposta imune do hospedeiro, além de favorecer trocas genéticas (Gilbert *et al.*, 1993).

O biofilme inicia-se com a película adquirida que consiste em vários componentes da saliva que aderem na superfície dental, como as mucinas e α -amilases (Kolebrander & London, 1993). A sucessão ecológica no biofilme supragengival resulta na maturação desta e influencia o estabelecimento do biofilme subgengival (Cobb & Killooy, 1990), entretanto, o ambiente subgengival é anaeróbico e menos sujeito a influências mecânicas que resultariam em redução do biofilme.

Apesar do grande número de espécies bacterianas identificadas no ambiente do sulco gengival e/ou bolsa periodontal, evidências revelam que o processo de destruição do periodonto envolve o estabelecimento e crescimento de poucas espécies bacterianas. Nesse quadro, aparentemente alguns anaeróbios Gram-negativos produtores de pigmento negro possuem um papel importante na etiopatogenia da doença periodontal. Entre as espécies conhecidas que pertencem ao grupo, a *Porphyromonas gingivalis* tem sido fortemente relacionada com a etiologia e progressão do processo de doença que envolve o periodonto (Slots, 1979; Socransky & Haffajee, 1992; Slots & Ting, 1999).

Lipídeos Bacterianos

Porphyromonas gingivalis é frequentemente encontrada no sulco gengival de pacientes que apresentam condições clínicas saudáveis, porém os níveis de contaminação são bem maiores em sítios com doença periodontal crônica (Socransky & Haffajee, 2005).

Na doença periodontal, o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, é indicado como sendo um dos responsáveis pela indução da reabsorção óssea. O LPS é uma combinação de lipídeo (lipídeo A) e polissacarídeo, sendo um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. O LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), por macrófagos e neutrófilos presentes em áreas infectadas por bactérias (Lindemann et al., 1988; Wilson et al., 1996), na calvária (Chiang *et al.*, 1999) e em fibroblastos do ligamento periodontal (Miyachi *et al.*, 2001). Estas citocinas são conhecidas como tendo um papel importante na patogênese da doença periodontal, porque causam inflamação e conseqüente destruição do tecido periodontal e reabsorção óssea, agindo de forma direta e indireta sobre os osteoclastos (Kobayashi *et al.*, 2000). Estudo realizado por (Wada *et al.*, 2004), demonstrou que em fibroblastos de ligamento periodontal, o LPS é capaz de induzir o aumento de RNAm de OPG e RANKL devido aos estímulos de IL-1 β ou TNF- α porém, estas células não são capazes de induzir osteoclastogênese. Resultados similares de aumento de RNAm de OPG e decréscimo de RNAm de RANKL foi observado em células de cementoblastos estimuladas com LPS de *P. gingivalis* (Nociti *et al.*, 2004).

Asay *et al.* (2003), utilizando somente lipídeo A sintetizado em cultura de células de osteoblastos (SaOS-2), observaram a capacidade deste lipídeo de induzir a diferenciação destas células em osteoclastos através da via “toll like” 4 e aumento da expressão de RANKL.

Recentes evidências têm demonstrado que *P. gingivalis* sintetiza duas grandes classes de lipídeos, entre elas as ceramidas, as quais juntamente com prostaglandina E₂, potencializam a liberação de interleucina 1 β em cultura de fibroblastos, além de alterar a morfologia destas células (Nichols *et al.*, 2004). Estes lipídeos foram isolados de sítios com doença periodontal instalada (Nichols, 1998), além de também terem sido recuperadas grandes quantidades deste lipídeo de tecidos gengivais retirados de sítios com doença periodontal, indicando a capacidade destes lipídeos de penetração tecidual (Nichols *et al.*, 2001). Evidências apontam que as fosfoglicerol-dihidroceraidas, sintetizadas por *P. gingivalis* foram os primeiros lipídeos da classe das ceramidas encontrados em sítios com doença periodontal. Deste modo, estas evidências sugerem que estes lipídeos são novos fatores de virulência de *P. gingivalis*.

Outras espécies bacterianas também sintetizam lipídeos, entre eles, o *Sphingobacterium* sintetiza o esfingolípido, uma fosfoetanolamina ceramida, que é responsável pela indução de apoptose em diversas linhagens celulares (Minamino *et al.*, 2003). A *Flavobacterium meningosepticum* sintetiza o lipídeo conhecido como flavolipina (Kawai *et al.*, 1988) e espécies de *Capnocytophaga* sintetizam sulfonilipídeos (Naka *et al.*, 2003).

Além desta primeira classe de lipídeos (as ceramidas), foi demonstrado que *P. gingivalis* produz uma segunda classe de lipídeos, as fosfo-di-etanolaminas, que também possuem a capacidade de estimular a produção de IL-1 β em cultura de fibroblastos. Esta nova classe de lipídeos não é considerada um esfingolípido uma vez que não contém um grupo amida ligado a cadeia de ácidos graxos (Nichols, submetido).

Ativação e diferenciação de osteoclastos

Embora a presença de microrganismos periodontopatogênicos seja fundamental para o início do desenvolvimento de doença, tem-se mostrado que a amplificação e a progressão desse processo são altamente dependentes das respostas imune e inflamatória geradas pelo hospedeiro em resposta as bactérias ou os seus produtos (Teng, 2003; Gemmell & Seymour 2004).

A resposta imune inflamatória, leva a destruição tecidual através de mecanismos que incluem a produção de enzimas envolvidas na degradação de tecido conjuntivo e da expressão de fatores de diferenciação e de ativação de osteoclastos (Baker, 2000; Boyle *et al.*, 2003). A reabsorção óssea alveolar é um evento chave nas doenças periodontais. Os ossos constituem um tecido metabolicamente ativo que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção, promovida pelos osteoclastos, e neoformação óssea coordenada pelos osteoblastos (Chambers *et al.*, 1984; Suda *et al.*, 1992). Estas células são originárias de diferentes linhagens celulares sendo que o osteoblasto se diferencia de células mesenquimais enquanto os osteoclastos são provenientes de células hematopoiéticas precursoras de monócitos/macrófagos.

Um avanço significativo nos estudos sobre osteoclastogênese, ocorreu após resultados obtidos em experimentos utilizando células de medula e/ou do baço de camundongos, cultivadas em conjunto com células mesenquimais, resultando na diferenciação de osteoclastos (Takahashi *et al.*, 1988). Durante a diferenciação de osteoclastos, descobriu-se que o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), o ativador do receptor do fator nuclear B (NF- κ B) ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG), que atua como repressor de RANKL, são essenciais para ativação e diferenciação de osteoclastos (Lacey *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999).

O RANKL é uma proteína de 317 aminoácidos que pertence a super família dos fatores de necrose tumoral (TNF). A principal função desta citocina na fisiologia óssea é estimular a diferenciação/ativação de células osteoclásticas, além de inibir a apoptose destas células (Khosla, 2001). Camundongos RANKL-*knockout* apresentaram uma severa osteopetrose com completa ausência de osteoclastos. Esta proteína é encontrada na forma solúvel ou ligada à membrana (Kong *et al.*, 1999), e é modulada pela ação de agentes como $1\alpha,25$ dihidroxivitamina D₃ e dexametasona.

O receptor RANK é uma proteína transmembrânica de 616 de aminoácidos que pertence à família dos receptores TNF (TNFR). Este receptor natural do RANKL é expresso em diferentes tipos celulares, entre eles, as células precursoras e osteoclastos maduros, enquanto o seu ligante, RANKL, é expresso por osteoblastos e células T ativadas. A ligação entre RANK-RANKL é essencial para a diferenciação e ativação de osteoclastos (Teitelbaum, 2000). A proteína OPG, que é sintetizada inicialmente como uma proteína de 401 aminoácidos, é posteriormente clivada ficando com uma composição final de 380 aminoácidos (Khosla, 2001). Após esta clivagem, a OPG perde seus domínios transmembrânicos e citoplasmáticos, sendo liberada como uma proteína solúvel por células estromais e/ou osteoblastos. Assim, a OPG difere das outras proteínas pertencentes à super família TNFR que continuam associados à membrana (Tan *et al.*, 1997). Contrariamente ao RANKL, camundongos OPG *knockout* exibem um fenótipo osteoporótico (Mizuno *et al.*, 2002).

A proteína M-CSF, que também é fundamental para a maturação de osteoclastos, se liga ao seu receptor nas células precursoras, desse modo emitindo sinais essenciais para a maturação e desenvolvimento de osteoclastos (Felix *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1990).

A transdução de sinal decorrente da estimulação do receptor RANK ocorre pela transmissão do sinal à porção citoplasmática do receptor denominado TRAF (TNFR-Associated Cytoplasmatic Factors) (Darnay *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1999), sendo o TRAF6, a molécula de maior importância neste processo (Ye *et al.*, 2002). Animais transgênicos com ausência do gene TRAF6, desenvolvem uma doença associada com aumento da massa do esqueleto devido a formação de um osso anormalmente denso chamada de osteopetrose (Lomaga *et al.*, 1999). A sinalização mediada pelo RANK, utiliza fatores citoplasmáticos que ativam uma cascata de sinalização mediada por proteínas quinases (MAPK), entre eles, o inibidor de NF- κ B quinase (IKK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK) e a cascata Src (Boyle *et al.*, 2003).

As MAPK são enzimas conservadas durante a evolução e que possuem a função de conectar receptores de superfície celular a reguladores intracelulares. Estas enzimas também são ativadas frente a estresse físico e químico, controlando a manutenção celular e sua adaptação (Chang & Karin, 2001). ERK1/2 têm sido relacionados à manutenção celular, enquanto JNK e p38 têm sido relacionadas à indução de apoptose (Xia *et al.*, 1995). Entretanto, cada enzima pertencente à cascata da MAPK tem funções diferenciadas e específicas para cada tipo celular.

A ativação do RANK através do seu ligante, permite a expressão de genes específicos da diferenciação, ativação e maturação de osteoclastos. As duas vias de transmissão de informação aparentemente de maior importância são a NF- κ B e AP-1 (activator protein-1). Na célula não estimulada, o NF- κ B está presente como um complexo trimérico dos componentes p50, p52 e I κ B, este último, um inibidor. A quinase IKK fosforila o inibidor dissociando-o do complexo. Sem a presença do inibidor, o NF- κ B move-se do citosol para o núcleo, onde se liga a um sítio específico desencadeando a transcrição do gene. A manipulação de células de ratos com deficiência de componentes p50/p52 pertencentes ao NF- κ B (Franzoso *et al.*, 1997), assim como c-Fos relacionado ao AP-1 (Grigoriadis *et al.*, 1994) resultou em ratos portadores de osteopetrose.

O NFATc1 (NFAT2) tem sido descrito como uma molécula importante na fase final da diferenciação de osteoclastos em resposta à estimulação por RANKL (Cappellen *et al.*, 2002). Em estudo conduzido com células tronco embrionárias de camundongos *knockout*

para o gene NFATc1, estas não foram capazes de se diferenciar em osteoclastos (Takayanagi *et al.*, 2002).

Com relação às doenças periodontais, estudos recentes têm demonstrado que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido gengival e no tecido periodontal em condições de doença. Tais estudos também sugerem que o balanço entre o RANKL e OPG supostamente determina a atividade da doença (Teng *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Garlet *et al.*, 2004).

Alguns autores, utilizando células precursoras de osteoclastos (CD14) com alto grau de pureza, na presença de RANKL e M-CSF, induziram pouco ou nenhum osteoclasto maduro. Quanto maior os controles do experimento, pior eram os resultados, em especial na ausência de plasma no meio (Susa *et al.*, 2004). A compreensão para tal fenômeno ainda não está clara, mas na tentativa de compreendê-lo novas evidências têm mostrado o envolvimento de outros mediadores co-estimulatórios críticos no processo de osteoclastogênese, tais como os receptores TREM-2/DAP12 e/ou OSCAR/FcR γ . A porção citoplasmática do DAP12 possui um receptor de ativação de tirosina que recruta a Syk tirosina quinase (McVicar *et al.*, 1998). Outro importante mediador de osteoclastogênese é o receptor de osteoclasto (OSCAR), que aparentemente se acopla ao ligante expresso por osteoblastos (Kim *et al.*, 2002). Além disso, tem sido especulado que a presença de antígenos bacterianos no plasma podem ativar uma via alternativa em células pré-osteoclásticas (Blair *et al.*, 2005).

RNA interference

Recentemente, uma nova ferramenta vem sendo cada vez mais utilizada para se estudar a função de genes: são os “short interfering RNAs” (siRNAs). São pequenas moléculas de RNA intermediárias de um processo conhecido como *RNA interference* ou interferência mediada por RNA. Embora não totalmente compreendido, o mecanismo de silenciamento por RNA foi primeiramente observado em plantas: pesquisadores trabalhando com plantas transgênicas tentavam produzir petúnias com uma pigmentação violeta mais intensa, inserindo como um transgene uma cópia extra do gene que produz a enzima responsável pelo pigmento floral. Contrariamente ao esperado, em vez de roxas, as

flores nasciam brancas. Ou seja, a cópia extra do gene para pigmentação não apenas não implicava em intensificação da cor como suprimia, inclusive, a transcrição do gene endógeno, fenômeno conhecido como "co-supressão". Mais tarde, os pesquisadores entenderam o mecanismo subjacente: o transgene provavelmente gerou, na planta, intermediários de RNA dupla-fita que reconheceram o mRNA homólogo (endógeno), causando sua degradação (Jorgensen *et al.*, 1996).

Em experimentos realizados no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, foi observado que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) eram capazes de abolir a expressão de um determinado gene com seqüência similar àquele dsRNA (Fire *et al.*, 1998). O RNA dupla-fita é importante no processo de silenciamento porque ele é clivado dentro da célula em fragmentos de 21-25 nucleotídeos por uma nuclease conhecida como Dicer. Essa enzima é homóloga à RNase III de *E. coli* e apresenta um domínio de ligação a dsRNAs e domínios helicase (Bernstein *et al.*, 2001). Os pequenos fragmentos de dsRNA, conhecidos como *small interfering RNAs* (siRNAs), correspondem às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (*RNA Interference Specificity Complex*). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita *antisense* do duplex guia o complexo até o mRNA alvo. Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o (Fire *et al.*, 1998; Hamilton & Baulcombe, 1999; Bernstein *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000)

O silenciamento nesse processo é causado por um mecanismo pós-transcricional: o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido, pois é antes degradado. O RNAi pode ser usado como uma ferramenta poderosa para a análise sistemática de função gênica.

As características que fazem da doença periodontal uma doença singular, como a anatomia da região periodontal e a diversidade de microrganismos que constituem o biofilme dental supra e subgingival, são uma verdadeira batalha contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Ao mesmo tempo em que a permanência de um foco infeccioso é potencialmente perigosa a saúde do hospedeiro, a manutenção prolongada de uma resposta imune e inflamatória leva a ocorrência de danos aos tecidos e suporte ósseo alveolar. Uma vez que a *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria diretamente relacionada com a doença

periodontal, e os seus metabólitos lipídicos recém caracterizados, têm se demonstrado participante ativo no desenvolvimento da doença periodontal.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar a participação de uma fração lipídica sintetizada por *P. gingivalis* na modulação da osteoclastogênese, além de caracterizar o receptor e a via de informação utilizada.

3. PROPOSIÇÃO

A bactéria *Porphyromonas gingivalis* sintetiza diversos fosfolipídeos, os quais estão associados à presença e progressão de doença periodontal. Em testes realizados em cultura de fibroblastos, o lipídeo fosfo-di-etanolamina foi responsável pela indução de secreção de mediadores inflamatórios, além de alterar a morfologia dos fibroblastos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade biológica do lipídeo fosfo-di-etanolamina sobre células precursoras de osteoclasto, além de caracterizar o receptor e a via intracelular de informação que este lipídeo desencadeia nestas células.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e caracterização da fração lipídica de *Porphyromonas gingivalis*

A fração lipídica foi isolada e caracterizada no Departamento de Periodontia da Universidade de Connecticut, pelo Dr. Frank C. Nichols e gentilmente cedida para a realização deste trabalho. Resumidamente, *P. gingivalis* ATCC 33277 foi crescida em meio de cultura ágar sangue, e as frações lipídicas foram isoladas e caracterizadas utilizando um HPLC acoplado a espectrômetro de massa de ionização por eletrospray (ESI) e espectrometria de massa tipo ‘tandem’ (MS-MS). As frações lipídicas foram dissolvidas em hexano:isopropanol (6:8, v/v) atingindo uma concentração final de aproximadamente 100 µg/ml.

Após o isolamento e caracterização, foi possível obter três frações lipídicas pertencentes à classe da fosfo-di-etanolamina com variados tamanhos da cadeia de carbono, entre eles uma fração contendo 17 (F17), outra com 24 (F24) e a última com 29 (F29) carbonos na cadeia. Nós realizamos testes preliminares de indução de osteoclastogênese com os três diferentes lipídeos, sendo que o único que apresentou efeito biológico foi a fração lipídica composta por 24 carbonos (F24). A estrutura química desta fração lipídica está representada na Figura 1.

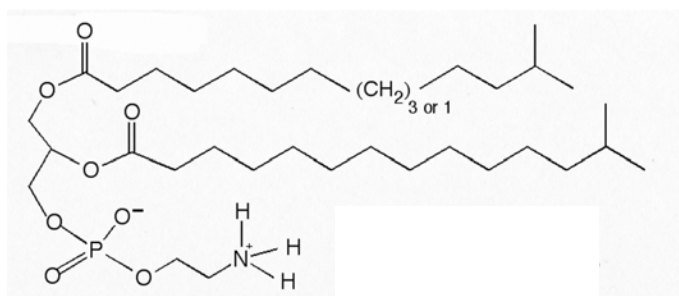


Figura 1: A estrutura química do lipídeo (F24) representada acima foi isolada e caracterizada do lipídeo sintetizado por *P. gingivalis* denominado F24.

Extração e purificação do LPS

Esta técnica foi realizada de acordo com Stead *et al.* (1975), que consistiu no tratamento da amostra bacteriana (*P. gingivalis*) com fenol a 45% (p/v) numa proporção de 10 g de bactérias para 100 ml de fenol. A massa bacteriana foi fracionada por agitação intensa inicialmente por 5 minutos em banho de gelo e depois durante 15 minutos em banho-maria à 72°C. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos em banho de gelo e foi centrifugada a 1.000 g por 30 minutos à 4°C. A fase aquosa foi removida e substituída por igual volume de água destilada, e o procedimento repetido por mais duas vezes para a re-extração do LPS, obtendo-se uma fase aquosa e fenólica que foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos e os sobrenadantes dializados durante dois dias contra água destilada à 4°C. Para a precipitação do LPS, o material foi tratado com acetona (3 vezes o volume) na presença de traços de cloreto de magnésio e deixado em repouso em banho de gelo por 2 horas.

Após nova centrifugação a 5.000 g por 10 minutos, os precipitados obtidos foram ressuspenso e dializados por 12 horas contra tampão Tris Acetato 0,025 M, pH 7,5 contendo 0,001 M de cloreto de magnésio e 0,02% de azida sódica. O material foi então tratado com 1 mg de DNase e 15 mg de RNase pancreática bovina durante 18 horas à 37°C sob agitação, e novamente centrifugado primeiro a 4.000 g por 1 hora e depois o sobrenadante a 100.000 g por 4 horas. Aos sedimentos, foram adicionados 30 ml de solução de uréia 6 M, após homogeneização, nova centrifugação a 100.000 g por 3 horas. Os sedimentos foram re-suspenso em 3 ml de água destilada, e finalmente liofilizados.

Cultura de células precursoras de osteoclasto

As células precursoras monócito/macrófago RAW264.7 e MOCP-5 (gentilmente cedida pelo Dr. Yi-Ping Li – Forsyth Institute) foram mantidas em garrafas de cultura de células de 25 cm² contendo 10 ml de Meio Eagle Modificado por Dulbeccos (D-MEM) (Gibco) acrescida de solução antibiótica penicilina/estreptomicina (Gibco) 100 mg/ml, 2,20 g/l bicarbonato de sódio e suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), em estufa de CO₂. Os experimentos destas células foram utilizadas após o terceiro repique.

Células precursoras de osteoclasto (monócitos) foram isoladas de sangue humano e de camundongos. Os voluntários eram saudáveis, não haviam feito uso de medicação antibiótica nos 3 meses anteriores ao experimento. Os voluntários participantes assinaram termo de esclarecimento e livre consentimento.

Sucintamente, no sangue colhido foram inicialmente adicionados 20 ml de tampão fosfato (PBS) e centrifugado a temperatura ambiente por 10 minutos a 1300 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado Histopaque® (Sigma) e novamente centrifugado por 15 minutos a 1300 rpm. Após este procedimento, foi possível visualizar a formação de duas fases e entre estas, uma camada densa, na qual encontram-se os monócitos. Cuidadosamente, com uma pipeta Pasteur, esta camada foi transferida para outro tubo e novamente centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado meio RPMI 1640 (Gibco) às células.

As células precursoras foram isoladas também da medula óssea de camundongos. Para tal, foram retirados o fêmur e a tíbia de camundongos com 7 semanas assepticamente. As pontas dos ossos foram cortadas e com uma agulha hipodérmica foi lentamente adicionado meio α -MEM (Sigma) no interior do ossos para recuperar as células presentes em uma placa de Petri. As células foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas e as células não aderentes foram re-suspensas, lavadas e utilizadas como células precursoras (Kobayashi *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2005).

Osteoclastogênese *in vitro*

As células RAW264.7 e MOCP-5 foram utilizadas para o experimento após atingirem a confluência na garrafa, possibilitando assim, o repique em placas de microtitulação com 96 poços. Após a tripsinização das células contidas na garrafa, foram adicionados 10 ml de D-MEM e transferido para tubo de centrífuga. As células foram submetidas a uma centrifugação de 1200 rpm a 10°C durante 5 minutos e ressuspensas em 2 ml de DMEM. Uma alíquota de 10 μ l desta suspensão de células foi transferida para a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Foi adicionada uma concentração final de 5×10^3 células/ml em cada poço. As células precursoras isoladas do sangue e de medula óssea foram adicionados à placa de Petri na concentração de 1×10^5 células/ml, suplementado com 10 ng/ml de M-CSF (Felix *et al.*, 1990). Em todos os experimentos, foi

adicionada uma concentração final de 10 μ M de vitamina D₃ (Hotokezaka *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2004).

As 5 diferentes culturas celulares testados foram estimulados com a fração lipídica isolada de *P. gingivalis* (F24) nas concentrações de 0,1 a 10 μ g/ml, e como controle foi utilizado um isômero estrutural lipídico 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamine (DMPE) (Sigma) e lipopolissacarídeo (LPS) isolado de *P. gingivalis* nas mesmas concentrações além de RANKL (Preprotech) a 50 ng/ml.

Um outro ensaio, utilizando células RAW264.7, foi realizado para verificar se a proteína inibitória de RANKL, a osteoprotegerina (OPG), possuía capacidade de inibir a diferenciação de células osteoclásticas quando estas fossem induzidas com F24. Para tanto às células RAW264.7 foram estimuladas com F24, RANKL, DMPE e LPS e acrescidas de 10 μ g/ml de OPG.

Novo meio de cultura foi adicionado a cada 3 dias e após maturação das células (6 dias para RAW264.7 e MOCP-5 e 10 dias para células de sangue e da medula óssea), foi realizada a imunocoloração para fosfatase ácida (TRAP). Os experimentos foram repetidos em dois momentos independentes sendo ambos em triplicata.

Coloração para Fosfatase ácida (TRAP)

Após a cultura, as células aderentes foram fixadas com 5% de formalina por 90 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e novamente incubadas por 90 minutos com solução de Tartrato 150 mM. Na seqüência, foram incubadas durante 10 minutos com solução de coloração para fosfatase ácida (TRAP). As células TRAP positivas apresentaram uma tonalidade vermelho-escuro (Kawai *et al.*, 2000). Apenas as células contendo mais de 3 núcleos (multinucleadas) coradas em vermelho-escuro foram contadas como sendo osteoclastos maduros (Figura 2).

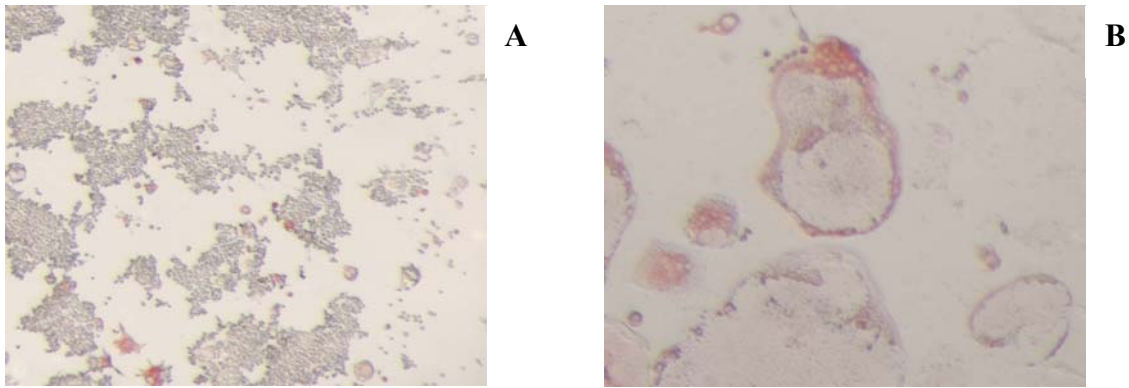


Figura 2. Células RAW264.7 após coloração com solução TRAP. A Figura A representa as células RAW264.7 após 6 dias de incubação apenas em meio de cultura (α -MEM). Nota-se que não existem células diferenciadas multinucleadas coradas em vermelho. A Figura B representa as células da mesma linhagem após incubação na presença de RANKL. É possível observar células diferenciadas, multinucleadas, coradas em vermelho característico de células osteoclásticas. Aumento de 100 vezes.

Descalcificação em discos de dentina bovina

Células RAW264.7 (concentração de 2×10^3 células/ml) cultivadas em D-MEM, foram cultivadas sobre discos de dentina (4 mm de diâmetro) e estimuladas, individualmente com F24, LPS, DMPE (10 μ g/ml) e RANKL (50ng/ml) por 10 dias. Novo meio de cultura contendo os reagentes foi adicionado a cada 3 dias. Após o período de incubação, os discos foram lavados inicialmente com PBS seguido de uma segunda lavagem com hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos para remoção das células aderidas. Os discos foram corados com azul de toluidina 0,5%, e os pontos de descalcificação causados pelos osteoclastos foram observadas com auxílio de um microscópio de luz (Mohamed *et al.*, 2005).

Quantificação de citocinas

As células RAW264.7 (2×10^5 células/ml) foram incubadas separadamente com F24, DMPE, LPS (nas concentrações de 0,1 a 10 μ g/ml) e RANKL (50 ng/ml) por 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi retirado para quantificar os níveis de IL-1 β , IL-6 e

TNF- α (R&D Biosystems) através de Elisa. As placas foram sensibilizadas com anticorpo primário para as três citocinas analisadas na concentração de 4 $\mu\text{g/ml}$ em tampão de bicarbonato de sódio (pH 7,2) durante 2 horas a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada com tampão PBST 3 vezes, e adicionado tampão de bloqueio (PBST acrescido de 1% de BSA e 5% de sacarose) por 1 hora em temperatura ambiente. Uma alíquota de 75 μl do sobrenadante da cultura foi adicionada e incubada por 1 hora em temperatura ambiente, seguido da adição de anticorpo de detecção para cada citocina (2 horas). Estreptavidina POD (Sigma) foi diluída em PBST e então aplicada e deixada por 30 minutos na placa de Elisa. A reação colorimétrica foi realizada com a adição de *o*-Phenylenediamine (Sigma) na presença de 0,02% de peróxido de hidrogênio diluído em tampão citrato. Após 10 minutos de incubação, a reação foi paralisada adicionando uma alíquota de 50 μl de ácido sulfúrico 2 N, e mensurado em leitor de Elisa com comprimento de onda de 490 nm.

Precipitação protéica de células RAW264.7

A F24, o LPS e o DMPE foram conjugados em pérolas de vidro utilizando protocolo previamente publicado (Green, 1969). As pérolas de vidro foram lavadas e tratadas com ácido clorídrico concentrado por 1 hora, seguido de enxague prolongado com água destilada. Após este procedimento as pérolas foram secas em estufa. À estas pérolas, foi acrescentado benzeno e deixado sob constante agitação por 2 horas, em temperatura ambiente. Após este período, as pérolas foram enxaguadas em água destilada para remoção de excesso de benzeno, e incubadas por 24 horas sob constante agitação com F24, LPS e DMPE (10 μg) para conjugação destes lipídeos às pérolas de vidro. Estas pérolas acopladas aos componentes que seriam testados foram armazenadas em água destilada.

As células RAW264.7 foram lisadas com tampão de lise, e as proteínas foram incubadas juntamente com as pérolas previamente conjugadas com F24, LPS ou DMPE, *overnight* a 4°C em constante agitação. Após este período, as pérolas foram lavadas e foi aplicado tampão de corrida Laemmli (Invitrogen) para posterior aquecimento a 100°C por 10 minutos. As proteínas que estavam aderidas às pérolas de vidro foram separadas eletroforéticamente (SDS-PAGE) em gel de gradiente 4-12% (Invitrogen). Após o término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue 0,04% (Blue Serva) seguido de lavagem

com solução descorante (50% de metanol e 10% de ácido acético) para visualização das bandas.

Foram extraídas as proteínas da membrana das células RAW264.7 para realizar o mesmo procedimento descrito acima. As células RAW264.7 foram crescidas até atingirem confluência em frascos de cultura, em seguida, às células foram tratadas com o kit de extração Proteo extract[®] (Calbiochem), seguindo instruções do fabricante. Ao final do procedimento, foram recolhidas as proteínas extraídas da membrana celular.

Após a separação eletroforética, foi possível observar o aparecimento de uma banda mais intensa quando as proteínas totais (A) foram incubadas com a F24, mas não na presença de LPS ou DMPE (Figura 3). Quando as proteínas de membrana foram incubadas com a F24, foi possível observar o aparecimento de duas bandas, sendo uma com aparente massa molecular próximo de 120 kDa e outra com aparente peso de 90 kDa (3B). Estas duas bandas visualizadas com as proteínas de membrana foram enviadas para sequenciamento protéico.

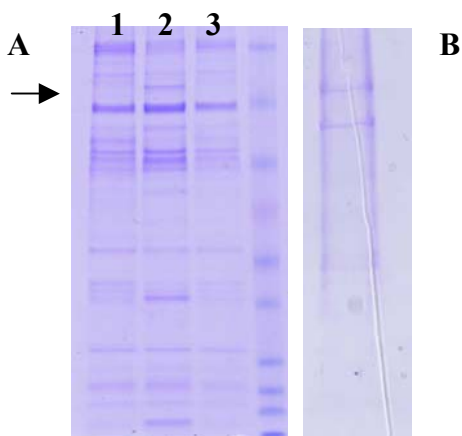


Figura 3. (A) Proteínas totais de células RAW264.7 co-precipitadas na presença de DMPE (1), F24 (2) e LPS (3). Nota-se o evidenciamento de uma banda de maior intensidade após a incubação na presença da fração lipídica F24. (B) Proteínas extraídas da membrana celular de RAW264.7 incubadas na presença de F24. As duas bandas evidenciadas na presença das proteínas de membrana (B), foram enviadas para sequenciamento de aminoácidos.

Sequenciamento de proteína

As duas bandas visualizadas após incubação da F24 com as proteínas de membrana das células RAW264.7, foram recortadas do gel após separação eletroforética e enviadas para sequenciamento no Centro de Genética e Genômica da Escola de Medicina de Harvard (Boston, EUA), para identificação.

Confirmação do receptor utilizando Microscopia de Varredura Laser Confocal (CLSM)

Após a identificação da proteína receptora da F24, as células RAW264.7 (1×10^5 células/ml) foram incubadas em D-MEM com F24 conjugada com biotina. Para realizar a conjugação da F24 com biotina foi utilizado o kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) seguindo as instruções do fabricante. As células RAW264.7 foram cultivadas sobre discos de vidro acondicionados em placas de 24 poços a 37°C, por 24 horas. Após este período, as células foram fixadas com 5% de formalina por 15 minutos e permeabilizadas com PBS acrescido de Triton X-100 a 0,1%, por 10 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com PBS acrescido de 1% de BSA, por 10 minutos, seguido de uma segunda incubação com PBS acrescido de 0,02 M de glicina, por 10 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-nucleolin (1:300) (Novus Biologicals), por 1 hora a 4°C. As células foram então lavadas com PBS acrescido de Triton X-100 na concentração de 0,1%. As células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com FITC (1:100) e Alexa Fluor 647 (1:100) a 4°C, por 60 minutos, em sala escura. Os discos foram montados em lâminas individuais para posterior visualização em microscópio confocal (Leica TCS SP2) com comprimentos de onda de 500-530 nm e 600-675 nm (Christian *et al.*, 2003).

Citometria de fluxo

Com o auxílio de um citometro de fluxo (EPICS Altra, Beckman Coulter, Miami, FL), foram isoladas células da medula óssea de camundongos que expressam o receptor nucleolin na superfície celular. Para tanto, foram utilizados os marcadores anti-camundongo CD11b (marcador de macrófago) (BD PharMingen) conjugado com FITC, anti-nucleolin de coelho e anti-IgG de coelho conjugada com PE. As células positivas e

negativas para o receptor estudado, foram assepticamente coletadas com o auxílio do citometro de fluxo (Valverde *et al.*, 2004).

As células nucleolin positivas e negativas foram cultivadas independentemente, em condições apropriadas, na presença do anticorpo para nucleolin imobilizado em placa de Elisa, RANKL, F24 e meio de cultura, para posterior análise de diferenciação e coloração por TRAP.

Quantificação de fosforilação de moléculas intracelulares

Células RAW264.7 (1×10^5 células/ml) foram estimuladas com a fração lipídica (F24) e RANKL com duração de 0, 5, 10, 15 e 30 minutos. Após os períodos pré-determinados de incubação, as células foram re-suspendidas em tampão de lise, centrifugadas e aos sobrenadantes foi adicionado tampão de corrida para separação eletroforética por SDS-PAGE. Em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) e incubadas em tampão TBST acrescido de 5% de leite desnatado por 2 horas em temperatura ambiente, seguido de imunoblotting com os anticorpos MAPK (ERK1/2, JNK e p38) e MAPK fosforilado (Cell Signaling) (1:2000), além da fosforilação da via Src (Cell Signalling) (1:1000). As membranas foram tratadas com ECL (Pierce) e as imagens capturadas utilizando filmes radiográficos (Kodak).

Interferência de RNA (RNAi) – *in vitro*

Inicialmente foi desenhado o RNA de dupla fita correspondente 21 aminoácidos e referente às moléculas TRAF6 e Syk. Este RNA de dupla fita (siRNA) foi baseado em 5 regras existentes para o desenho e sumarizados pela Xeragon™ (http://www.xeragon.com/siRNA_support.html). Estas cinco regras visam obter um primer altamente específico, sendo elas: 1) evitar as primeiras 75 bases após o códon de iniciação; 2) conter aproximadamente 50% de G+C; 3) extremidade 5' da fita *antisense* seja rica em AU; 4) extremidade 5' da fita *sense* seja composta de G ou C para apresentar uma maior estabilidade interna; 5) comprar os prováveis candidatos de siRNA com seqüências já conhecidas utilizando banco de dados público (por exemplo BLAST, MedLine).

O siRNA foi incorporado as células precursoras de osteoclastos RAW264.7 através de transfecção por lipossomos (Lipofectamine 2000 [Life Technologies] e TransMessenger

[Qiagen]), seguindo protocolo previamente publicado (Shibata *et al.*, 2002). As células RAW264.7 (5×10^3 células/ml) foram pré-incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ previamente ao tratamento com RNAi. Um total de 0,3 µg de siRNA (TRAF6 ou Syk) e 15 µl de lipossomo, foram misturados em 100 µl de meio de cultura D-MEM e adicionados aos poços contendo as células, para incubação por um período de 4 horas. Após a transfecção do siRNA foram adicionadas, independentemente, RANKL e a fração lipídica (F24) em diferentes concentrações e incubados por 6 dias para posterior coloração com solução TRAP e contagem de células diferenciadas TRAP⁺.

Para confirmar a supressão da expressão dos genes TRAF6 e Syk, após o tratamento com siRNA foi realizado em Western blot das proteínas totais utilizando anticorpos para TRAF6 e Syk (Santa Cruz).

Osteoclastogênese *in vivo*

Ratos BALB/c com 6-7 semanas de idade foram utilizados para avaliar o potencial de indução de osteoclastos *in vivo*. Para tanto, foram aplicadas injeções de F24, LPS, RANKL ou PBS (controle negativo) durante três dias consecutivos na região da sutura calvariana dos animais (50 µl). Os animais foram sacrificados no 10º dia após a primeira injeção. O experimento foi realizado duas vezes, de modo independente, com resultados semelhantes, sendo que, cada grupo era composto de 3 animais.

Os crânios foram removidos e limpos, seguido de fixação em formalina 5% por 2 dias e descalcificação com EDTA 10% (pH 7,0) por 21 dias, com troca diária do EDTA. A região onde foram realizadas as injeções das soluções teste foram embebidas em OCT (Miles) e congeladas a -70°C para posterior obtenção de secções de 4 µm de espessura em micrótomo resfriado (-20°C).

As secções foram então coradas com solução TRAP para evidenciar a presença de células osteoclásticas e fotografadas com o auxílio de um microscópio de luz.

Este experimento foi conduzido de acordo com as normas de experimentação em animal, sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Forsyth, Boston-EUA

5. RESULTADOS

Osteoclastogênese in vitro

Foram testados 5 diferentes linhagens celulares para verificar a capacidade de indução de osteoclastogênese. Para tanto, foi utilizada a fração lipídica isolada de *P. gingivalis* (F24), LPS, DMPE (em três diferentes concentrações) além de RANKL (50 ng/ml). Em testes realizados previamente, foram delineadas as concentrações que seriam utilizadas no estudo. Neste estudo prévio, foi realizado uma curva dose-resposta de 0,1 a 50 µg/ml das soluções testes utilizadas, e, de acordo com os resultados apresentados foi estipulado que as concentrações ideais do estudo encontravam-se entre 0,1 a 10 µg/ml.

As células foram incubadas de acordo com o tempo necessário para cada linhagem celular, e, em seguida, foi realizada a coloração para fosfatase ácida (TRAP). As células diferenciadas multinucleadas coradas em vermelho-escuro foram contadas com o auxílio de um microscópio de luz. A Figura 4 mostra o número de células multinucleadas características de osteoclasto. A fração lipídica F24 demonstrou uma alta atividade biológica dose-resposta dependente capaz de estimular a formação de osteoclastos na cultura de células RAW264.7 após 6 dias de incubação, sendo a concentração de 10 µg/ml, a que induziu o maior número de osteoclastos ($61,3 \pm 2,51$) comparado aos níveis atingidos pela indução de RANKL ($73,3 \pm 4,51$). Os controles LPS ($11,3 \pm 3,05$) e DMPE ($9 \pm 1,73$) nas mesmas concentrações não demonstraram grande eficácia na diferenciação destas células (Figura 4A).

As células MOCP-5 (Figura 4B), são células precursoras que não expressam o receptor RANK. Em nosso experimento, a F24 foi capaz de induzir a diferenciação de osteoclastos em números significativamente maiores quando comparados com os controles DMPE, LPS e RANKL, especialmente na concentração de 10 µg/ml, o que nos levou a especular se a F24 utilizaria um receptor para estimulação da osteoclastogênese independente do RANK.

A Figura 4C mostra os valores obtidos nos experimentos com células precursoras oriundas da medula óssea de camundongos. Nestas células, a F24 se mostrou eficaz na indução de osteoclastos, em níveis comparados com o RANKL, especialmente nas concentrações de 0,1 e 1 µg/ml, sendo que seu efeito diminuiu em maiores concentrações.

A F24 apresentou efeitos significativos em células precursoras coletadas de sangue tanto de camundongos como de humanos. O efeito da F24 sobre as células precursoras de osteoclasto coletadas do sangue periférico de camundongos, mostrou o maior efeito de indução (Figura 4D). Foi possível observar um alto número de células características de osteoclasto induzidas pela F24 na concentração de 10 µg/ml, aproximadamente 5 vezes maior que o induzido pelo RANKL.

A última linhagem celular avaliada, foi os monócitos de sangue humano (Figura 4E). Neste experimento, a F24 mostrou-se mais eficaz na estimulação da osteoclastogênese nas concentrações inferiores, sendo que 1 µg/ml demonstrou os melhores resultados.

Interessante notar que, em nenhuma das cinco linhagens celulares testadas o lipopolissacarídeo isolado de *P. gingivalis* (LPS), foi capaz de induzir significativamente a diferenciação e maturação de osteoclastos, assim como o isômero DMPE.

A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína que age de maneira a evitar a ligação RANK-RANKL e a consequente ativação da cascata de sinalização intracelular da osteoclastogênese. No experimento realizado, demonstramos que a OPG teve efeito inibitório significativo sobre a indução de osteoclastos nas células estimuladas com RANKL (teste *t*, $p < 0.05$), entretanto, foi observado um baixo efeito inibitório (não estatisticamente significativo), desta molécula às células estimuladas com a F24 (Figura 5), indicando que a OPG não é capaz de influenciar negativamente a indução de osteoclastos quando estimuladas com a F24. Isto reforça a tese de que a F24 induz a ativação de osteoclastos por uma via alternativa.

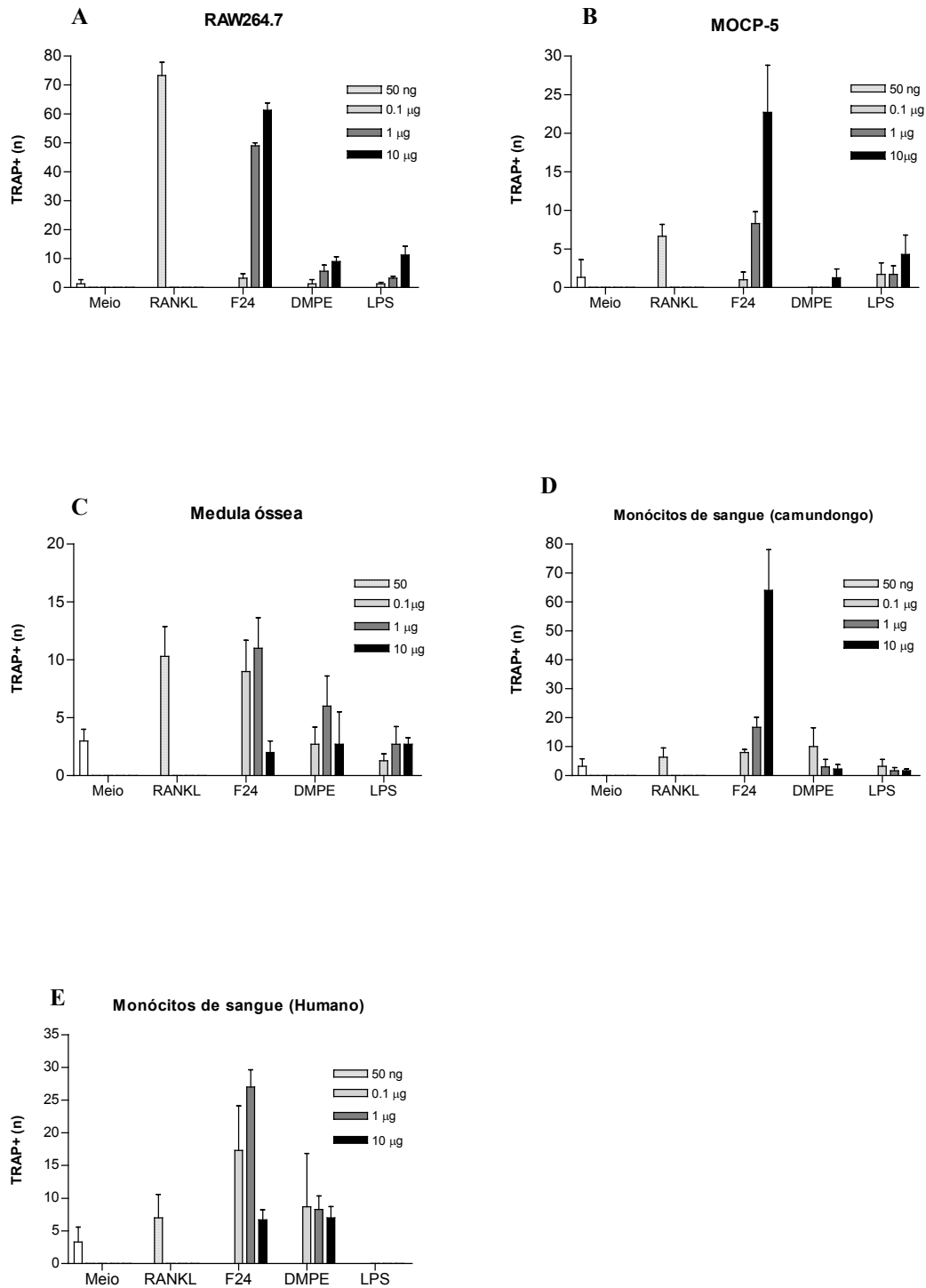


Figura 4: Cinco linhagens celulares utilizadas para verificar a capacidade de indução de osteoclasto pela fração lipídica isolada de *P. gingivalis*. (A) RAW264.7; (B) MOCP-5; (C) Células precursoras da medula óssea; (D) Células precursoras de sangue de camundongo; (E) Células precursoras de sangue humano. Os gráficos representam o número de células coradas com fosfatase ácida (TRAP) após o cultivo. Os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata. Valores da média \pm desvio padrão.

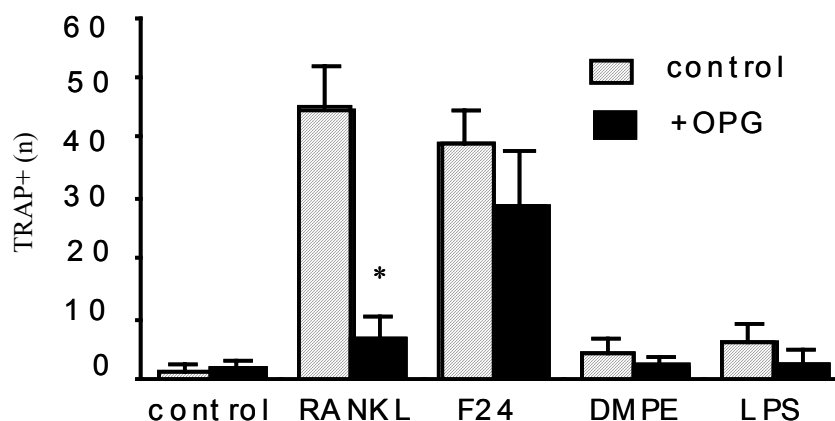


Figura 5: Células RAW264.7 estimuladas com RANKL, F24, DMPE e LPS contendo meio de cultura ou acrescido de osteoprotegerina (OPG). Foi possível observar uma inibição de indução de osteoclastos estatisticamente significativa promovido pela OPG sobre as células estimuladas com RANKL ($p < 0.05$), entretanto sobre as células que foram estimuladas com F24, não foi observado um decréscimo estatisticamente significativo ($p > 0.05$) no número de osteoclastos maduros.

Descalcificação de discos de dentina

A Figura 6 ilustra a presença de lacunas de reabsorção formada sobre dentina promovida pelos osteoclastos de células RAW264.7 estimulados com RANKL e F24, indicando que ambas as substâncias induzem a formação de osteoclastos maduros com atividade de reabsorção, praticamente inexistente sobre o disco estimulado por LPS. Não foi possível observar a presença de lacunas sobre o disco de dentina contendo apenas meio de cultura (controle negativo).



Figura 6: Células RAW264.7 foram estimuladas com F24, RANKL, LPS sobre dentina bovina por 10 dias. Após o período de incubação, as células foram removidas e a dentina corada com azul de toluidina. As lacunas de reabsorção provocada pelos osteoclastos foram visualizados em microscópio de luz. Aumento de 1000 vezes.

Quantificação de citocinas

Algumas citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α desempenham papel importante na indução da osteoclastogênese. Este experimento foi realizado para avaliar se o lipídeo em estudo estaria induzindo a formação de osteoclastos devido à indução de uma dessas citocinas. Células RAW264.7 foram incubadas com F24, DMPE, LPS (0,1 a 10 μ g/ml) e RANKL (50 ng/ml), e após 24 horas o sobrenadante foi utilizado para quantificação das citocinas. A Figura 7 ilustra os resultados dos experimentos conduzidos, sendo que a F24 não induziu a liberação de IL-1 β e os valores de IL-6 e TNF- α foram baixos nas três concentrações utilizadas no estudo, não sendo suficientes para induzir a osteoclastogênese. O lipopolissacarídeo de *P. gingivalis* induziu a liberação das três citocinas analisadas, em especial o TNF- α na concentração de 10 μ g/ml.

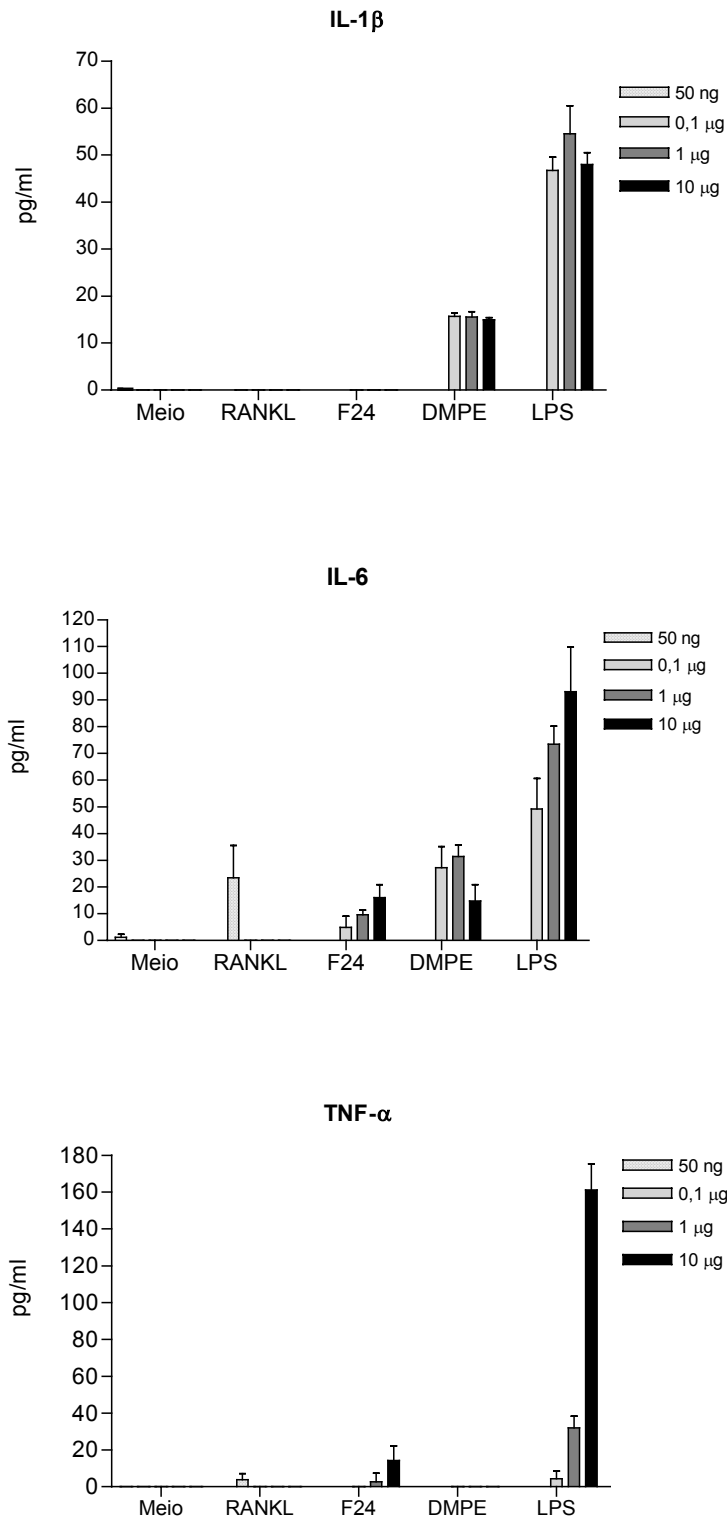


Figura 7: Células RAW264.7 foram cultivadas na presença de RANKL (50 ng/ml), F24, DMPE e LPS (0.1, 1 e 10 μg/ml) durante 24 horas. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de IL-1β, IL-6 e TNF-α. Os gráficos representam valores da média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

Identificação da proteína receptora

Após a separação eletroforética por SDS-PAGE das proteínas totais incubadas na presença da F24, foi possível observar uma banda mais evidente quando co-precipitada com o lipídeo fosfo-di-etanolamina (F24). Em seguida, as proteínas da membrana de células RAW264.7 foram co-precipitadas com F24 (Figura 3), permitindo a visualização da presença de duas bandas (maior peso molecular ~120 kDa e a de menor peso molecular ~90 kDa). As duas bandas evidenciadas após estímulo da F24 com proteínas isoladas da membrana celular foram identificadas através de espectrometria de massa, sendo possível recuperar 9 seqüências peptídicas. De posse destas seqüências peptídicas, foi possível, comparar as seqüências obtidas com aquelas disponíveis no banco de dados de seqüências protéicas presente no MedLine, identificar que ambas as bandas eram a proteína conhecida como nucleolin (Figura 8).

```
>gi|31543315|ref|NP_035010.2| nucleolin [Mus musculus]
MVKLAKAGKTHGEAKKMAPPPKEVEEESEDENMSEDEDEKIPPEEEVVIPOKKGKK
ATTPPAKKVVVSQTKKAAVPTPAKKA AVTPGKKAVATPAKKNITPAKVIPTPGKK
GAAQAKALVPTPGKKGAATPAKGAKNGKNAKKEDESEDEDEDEDEDDSEDEDEDEE
EDEFEPPIVKGVKPAKAAPAASEDEDEDEDEDEDDDEEEHDSEEEVMEIT
TAKGKTPAKVVPMAKASVAEEEDDEEEDEDEDEDEDEDEDEDEDDDEEEEEEPV
KAAPGKRKKEMTKQKEAPEAKKQKVEGSEPTTPFNLFIGNLNPNKSVNELKFAIS
ELFAKNDLAVVDVRTGTNRKFGYVDFESAEDLEKALELTGLKVFGNEIKLEKPKG
RDSKKVRAARTLLAKNLSFNITEDELKEVFEDAMEIRLVSQDGKSKGIAYIEFKS
EADAEKNLEEKQGAEIDGRSVSLYYTGEKGQRQERTGKTSTWSGESKTLVLSNLS
YSATKETLEEVFEKATFIKVPQNPHGKPKGYAFIEFASFEDAKEALNSCNKMEIE
GRTIRLELQGSNSRSQPSKTLFVKGLSEDTTEETLKESFEGSVRARIVTDRETGS
SKGFGFVDFNSEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGGFGRGGGRGGF
GGRGGGRGGRGGFGGRGRGGFGGRGGFRGGRGGGGDFKPQGGKTKFE
```

Figura 8: Após sequenciamento protéico de ambas as bandas visualizadas em gel de SDS-PAGE, foram obtidos fragmentos peptídicos. A seqüência de aminoácidos que estão destacados em negrito, representa a seqüência peptídica da banda de aparente maior peso molecular (~120 kDa), e as seqüências sublinhadas representa a seqüência peptídica da banda de aparente menor peso molecular (~90 kDa).

Co-localização do receptor nucleolin e da fração lipídica 24 na membrana celular

Com o auxílio de um microscópio de varredura laser confocal, foram obtidas imagens que possibilitaram localizar o receptor (nucleolin) e a F24 na membrana de células RAW264.7. É possível observar que a nucleolin (representada pelos pontos verdes) está presente tanto na parte externa (membrana) como interna (citoplasma). Já a F24, corada em vermelho, está presente exclusivamente na membrana celular, indicando que o lipídeo não é carregado para o interior da célula (Figura 9). Além disso, é possível visualizar pontos amarelos que indicam interação (co-localização) entre a proteína de membrana, nucleolin, e o lipídeo F24.

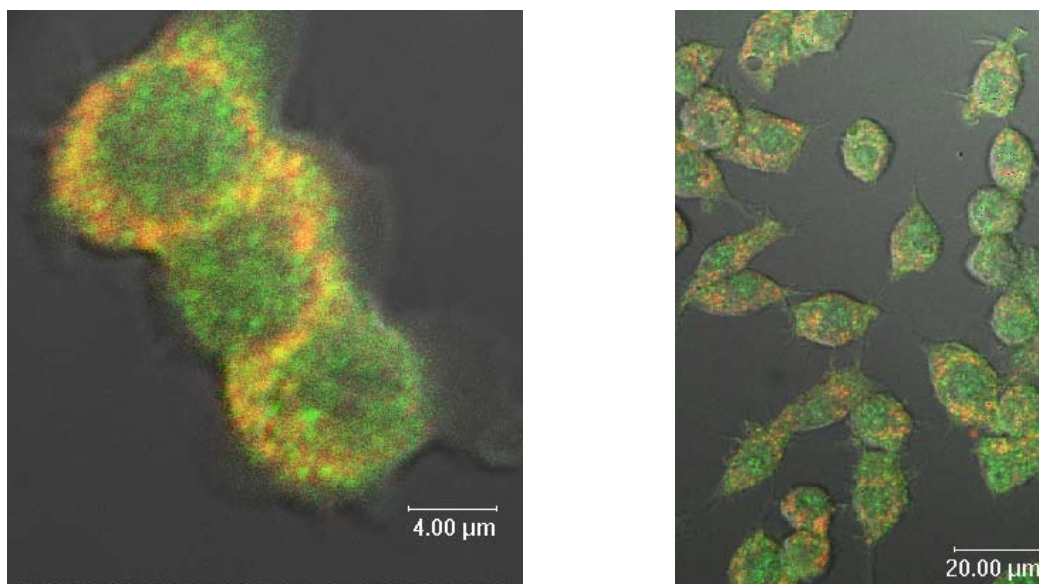


Figura 9: Localização da nucleolin (anti-Nucleolin/FITC de coelho e anti-coelho IgG [verde]) e F24 (F24 conjugado com biotina/Alexa 647 [vermelho]) em cultura de células RAW264.7. As células foram observadas em um microscópio de varredura laser confocal. A F24 aparece co-localizada com a Nucleolin, na membrana celular (pontos amarelos). A escala esta expressa em micrômetros.

Citometria de fluxo

Com o auxílio de um citometro de fluxo, foi possível separar as células da medula óssea de camundongos que expressam a molécula nucleolin na superfície das células, assim

como as células que não expressavam a referida molécula. As células positivas para o marcador CD11b e nucleolin formaram 1,3% do total das células, enquanto que para as células cultivadas na presença de M-CSF este número foi de 4,0% das células totais (Figura 10). É conhecido que o M-CSF é necessário para indução da expressão de RANK na superfície de células de medula óssea, e, de acordo com nossos resultados, aparentemente esta molécula também é capaz de induzir o aumento de expressão de nucleolin na superfície destas células.

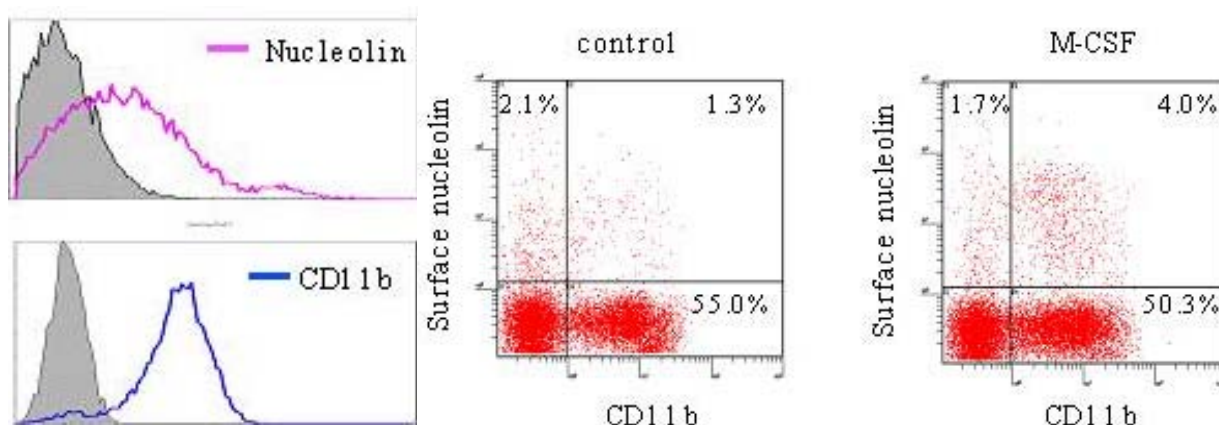


Figura 10: Citometria de fluxo para separação das células da medula óssea de camundongos que expressam nucleolin na superfície celular. Foram utilizados o marcador de monócito CD11b, além do anticorpo para nucleolin. As células que foram identificadas como positiva para CD11b e nucleolin foram separadas e cultivadas.

Com o objetivo de comprovar o aumento da expressão de nucleolin na presença de M-CSF, realizamos Western blot de proteínas totais de células de medula óssea de camundongos cultivadas na presença ou não de M-CSF, sendo possível visualizar o aumento de expressão protéica induzida por esta molécula, tanto na nucleolin como no controle RANK (Figura 11).

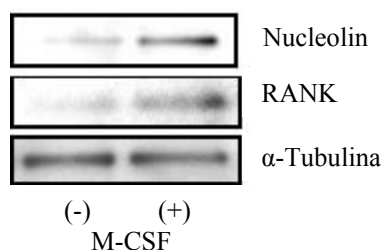


Figura 11: Expressão protéica por Western Blot de proteínas de medula óssea de camundongos cultivadas na presença ou não de M-CSF. É possível observar que as células cultivadas na presença do M-CSF demonstraram expressão aumentada tanto de nucleolin como de RANK, indicando que esta molécula pode ter um papel importante na expressão de nucleolin na superfície.

As células que possuem nucleolin na superfície assim como as que não apresentam (identificadas como células positivas e negativas) foram então cultivadas, separadamente, na presença de anti-nucleolin imobilizada, F24 e RANKL por 10 dias e posteriormente coradas (TRAP). Foi possível observar a diferenciação de osteoclastos provenientes das células positivas para nucleolin na superfície celular nos três grupos analisados, em especial, as células cultivadas na presença da F24 (Figura 12A). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA, $p > 0.05$). No grupo de células nucleolin-negativas, apenas o RANKL apresentou números expressivos de diferenciação de osteoclastos. As células cultivadas com anti-nucleolin imobilizada ou com F24 induziram um número baixo de osteoclastos maduros (Figura 12B), o que sugere que células que expressam nucleolin na superfície são estimuladas com F24.

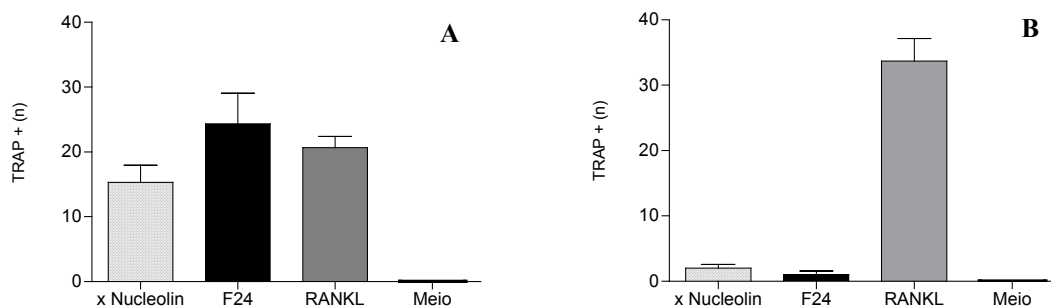


Figura 12: Células de medula óssea de camundongos BALB/c foram isoladas com o auxílio de um citometro de fluxo e cultivadas na presença de anti-nucleolin imobilizada, F24 e RANKL. (A) As células que expressam nucleolin na superfície foram estimuladas e diferenciadas em osteoclasto nos três grupos testados, sendo que a F24 induziu um maior número de células, entretanto não houve diferença estatística significativa (ANOVA, $p > 0.05$). (B) Foi observada diferenciação expressiva das células que não apresentam nucleolin expressa na superfície, quando cultivadas com RANKL, enquanto anti-nucleolin imobilizada e F24 não induziram números expressivos de osteoclastos, indicando que a F24 utiliza este receptor para diferenciação de osteoclastos.

Sinalização intracelular

As células RAW264.7 foram estimuladas com F24 ou RANKL, em diferentes tempos 0, 5, 10, 15 e 30 minutos, para posterior realização de Western Blotting. As células estimuladas com RANKL apresentaram fosforilação da proteína p38 de maneira crescente a partir do tempo inicial de 5 minutos, enquanto as células incubadas com a F24 fosforilaram a proteína p38 de forma decrescente nos tempos iniciais de 5 e 10 minutos de incubação (Figura 13).

Já as proteínas ERK1/2 e JNK também demonstraram fosforilação de intensidade crescente quando incubadas com RANKL, de acordo com o tempo de incubação atingindo pico de fosforilação em 30 minutos. As células incubadas com a F24 também foram capazes de fosforilar as proteínas ERK1/2 e JNK porém mais lentamente, com pico de intensidade após 30 minutos (Figura 13), sugerindo que a F24 e o RANKL utilizam as mesmas vias de sinalização porém em tempos e intensidade distintas.

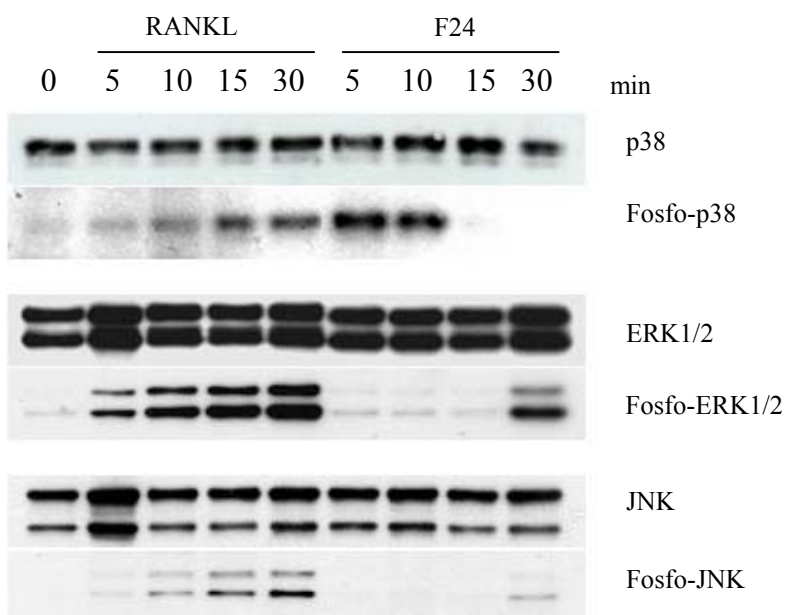


Figura 13: Efeito da fração lipídica isolada de *P. gingivalis* (F24) e RANKL sobre a fosforilação das proteínas pertencentes à família das MAP quinase de células RAW264.7. As células foram cultivadas em placas de 24 poços em uma concentração de 10^5 células/ml em tempos de 0, 5, 10, 15 e 30 minutos. Após a cultura as células foram lisadas e as proteínas preparadas para Western Blot.

Com o objetivo de compreender a via de transmissão de sinal intracelular, as células RAW264.7 foram cultivadas em meio de cultura (controle negativo), F24, DMPE e RANKL. As proteínas celulares foram isoladas e realizado Western Blotting para analisar a se o Src estava fosforilada após a estimulação. O resultado demonstrou que a proteína Src foi fosforilada apenas na presença da F24, indicando uma possível via alternativa utilizada pela F24 (Figura 14).

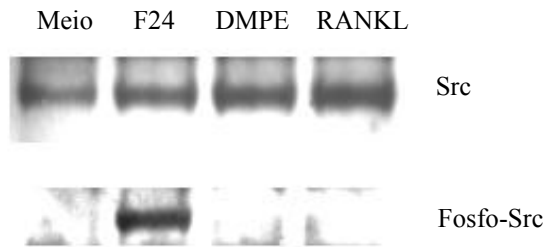


Figura 14: Efeito da fração lipídica isolada de *P. gingivalis* (F24), DMPE e RANKL sobre a fosforilação da proteína Src de células RAW264.7. Após a cultura as células foram lisadas e as proteínas preparadas para Western Blot.

Para investigar qual a molécula adaptadora foi utilizada pela F24 comparada com o RANKL, utilizamos a interferência por RNA (RNAi). Para tanto, as células RAW264.7, foram incubadas apenas com o lipossomo (RNAi), TRAF6-RNAi ou Syk-RNAi e seguido de estimulação por RANKL e F24 para posterior contagem das células maduras de osteoclastos.

Foi realizado Western blot para confirmação da eficiência do RNAi sobre as proteínas das células RAW264.7. Como é possível observar, as células incubadas apenas com o lipossomo de transfecção (RNAi) mostram uma quantidade de proteínas expressas num nível basal. Porém, quando é adicionado RANKL às células incubadas com RNAi (lipossomo), nota-se um aumento expressivo das proteínas de TRAF6. (Figura 15). As células transfectadas com TRAF6-RNAi seguida de estimulação por RANKL, mostram os mesmo níveis basais encontradas nas células que não foram estimuladas com RANKL (Figura 15).

As células incubadas com TRAF6-RNAi mostraram uma redução estatisticamente significativa no número de células TRAP⁺ quando estimuladas com RANKL (Newman-Keuls, $p < 0.01$). Resultados similares de redução de número de osteoclastos maduros decorrentes da adição de TRAF6-RNAi, foram observados nas três diferentes concentrações de F24 utilizadas (Newman-Keuls, $p < 0.01$) (Figura 15), sugerindo que a TRAF6 também é a via da F24.

Quando as células foram incubadas com Syk-RNAi (Figura 15), foi possível observar uma redução significativa do número de células maduras de osteoclastos (Newman-Keuls, $p < 0.05$), porém, é possível notar que a redução foi menos significativa se comparada com o TRAF6-RNAi.

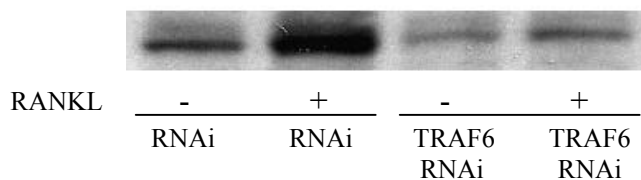
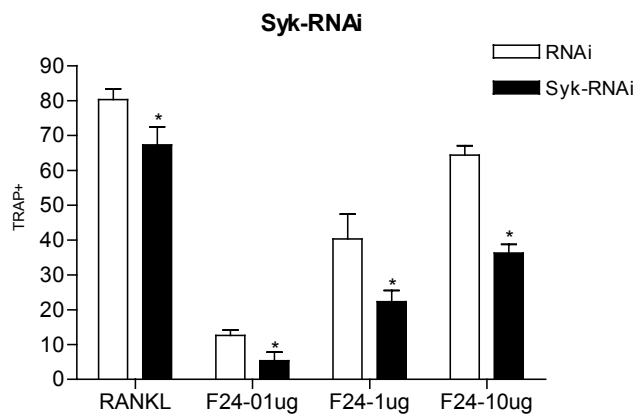
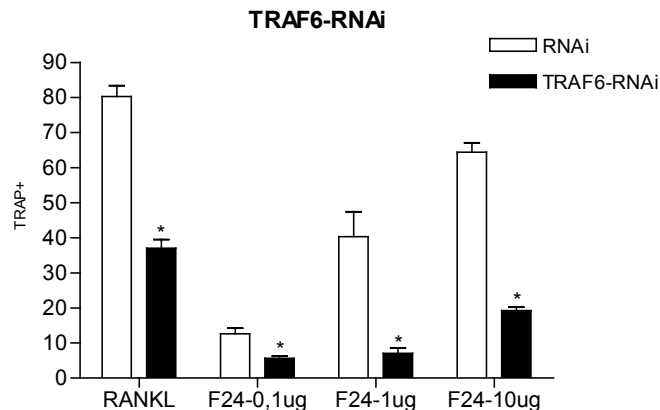


Figura 15: Células RAW264.7 foram transfectadas com TRAF6-RNAi e Syk-RNAi sendo posteriormente estimuladas com RANKL (50 ng/ml) e F24 nas concentrações de 0,1 a 10 µg/ml. Após incubação, as células foram coradas com solução TRAP e contadas. Foi realizado Western blot para confirmar a efetividade da TRAF6-RNAi na redução de expressão protéica. É possível observar um aumento na expressão quando as células foram estimuladas com RANKL, na presença apenas do lipossomo, e a diminuição desta expressão quando foi associado o TRAF6-RNAi.

Capacidade de indução de osteoclastogênese in vivo

Com objetivo de avaliar a capacidade de indução de osteoclastos *in vivo*, foi injetado F24, LPS, RANKL e PBS na calvária de animais, e, após 10 dias os animais foram sacrificados e o crânio foi descalcificado, cortado em secções de 4 μm e corados com solução TRAP para visualização de células osteoclasticas. Foi possível observar a presença de osteoclastos (corados em vermelho), nos animais em que foram aplicadas frações lipídica isoladas de *P. gingivalis*, F24, (Figura 16A), LPS (Figura 16B) e RANKL (Figura 16C). Nos animais que foram aplicados PBS (controle negativo), não foi observado nenhuma célula osteoclastica (Figura 16D). Interessante foi a constatação que ao redor do local da punção de LPS havia uma área de infiltrado inflamatório que não foi observado nos demais grupos (dados não mostrados).

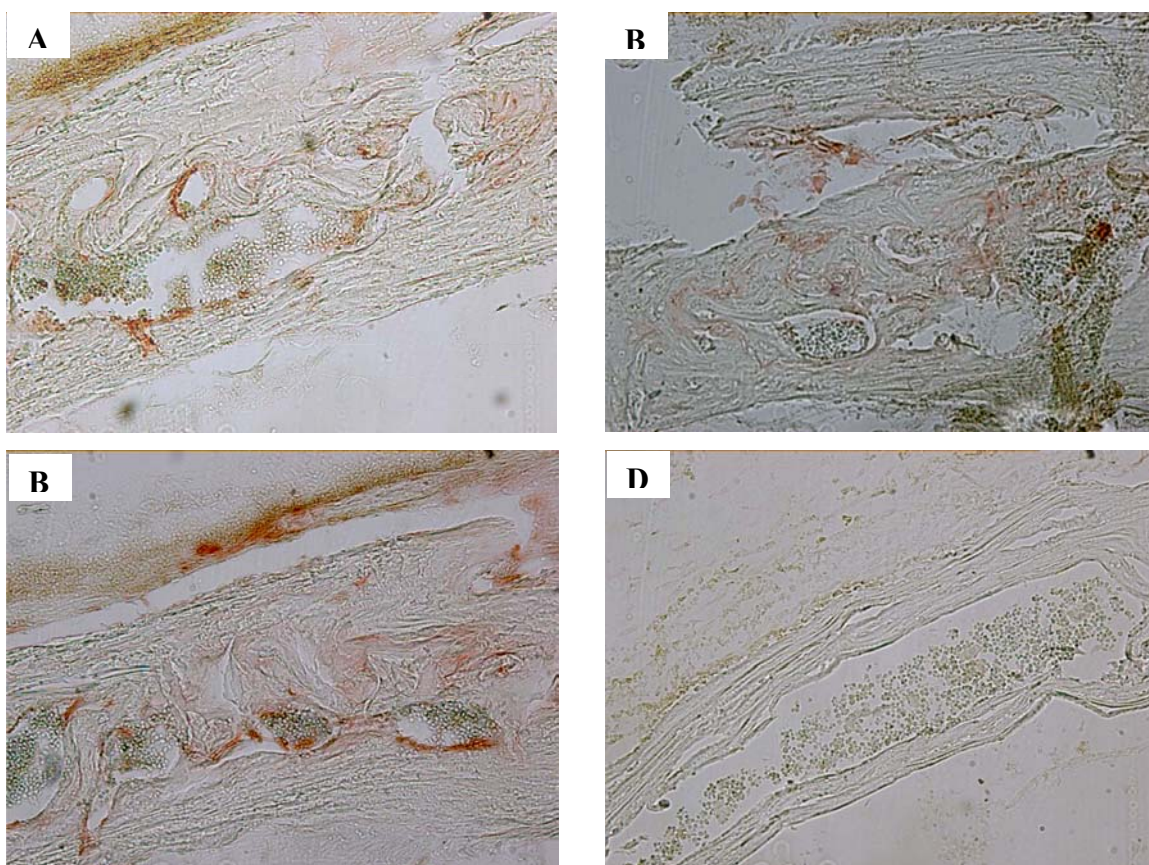


Figura 16: Secções da calvária de camundongos coradas com solução TRAP, para evidênciação de células osteoclasticas. (A) F24; (B) LPS; (C) RANKL; (D) PBS.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento e a homeostasia do sistema esquelético dos vertebrados é um processo dinâmico que depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. O desequilíbrio neste sistema em favor dos osteoclastos, desencadeia uma reabsorção óssea patológica acarretando o aparecimento de diferentes doenças, entre elas artrite reumatóide, doença periodontal, osteoporose, doença de Paget e tumores ósseos (Rodan & Martins, 2000).

Em trabalhos recentes, tem sido relacionado à presença de lipídeos sintetizados por *P. gingivalis*, estruturalmente diferente do lipopolissacarídeo, e o estabelecimento e progressão da doença periodontal (Nichols, 1998; Nichols *et al.*, 2001). Embora estes lipídeos possam penetrar no tecido gengival, o papel desempenhado por eles na patogênese da doença periodontal não é conhecido. Estudos preliminares mostraram que entre os lipídeos isolados de *P. gingivalis* apenas aqueles correspondentes a fração lipídica fosfo-di-etanolamina (F24) foram capazes de induzir efeitos biológicos significativos, tais como a diferenciação de osteoclastos.

Tendo como objetivo investigar a participação da F24 sintetizada por *P. gingivalis* na modulação da doença periodontal, inicialmente testamos a hipótese deste lipídeo exacerbar a liberação de diferentes citocinas pró-inflamatórias, em cultura de células. Itoh *et al.* (2003) demonstraram que osteoclastos estimulados com LPS não foram capazes de induzir níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

A segunda hipótese testada, foi avaliar um possível potencial de indução de osteoclastogênese por parte desta fração lipídica. Para verificar tal hipótese, utilizamos a fração lipídica em cinco diferentes linhagens de células precursoras, o que nos permitiu observar que a F24 demonstrou uma capacidade de induzir osteoclastogênese, em todas as linhagens testadas, sendo que em algumas destas (monócitos de células hematopoiéticas), com resultados muito superiores quando comparado com o RANKL. Mais uma vez, o LPS isolado de *P. gingivalis* não demonstrou capacidade de induzir células precursoras a se diferenciarem. Inicialmente, era esperado que as células precursoras pudessem diferenciar-se em osteoclastos quando estimuladas com LPS, devido a um aumento na expressão de RANKL, visto que o LPS aumenta a produção de RANKL em osteoblastos e linhagens

celulares osteoblásticas (Sakuma et al., 2000; Kikuchi et al., 2001). Nossos resultados são similares aos de Wada *et al.* (2004) e de Nagasawa *et al.* (2002), os quais não conseguiram induzir a diferenciação de monócitos em osteoclastos com LPS.

É bem conhecido que componentes bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) estimulam a liberação de mediadores inflamatórios, induzindo uma resposta imunológica muitas vezes exacerbada que pode desencadear uma reabsorção óssea inflamatória, como no caso das doenças periodontais. O lipopolissacarídeo isolado de *P. gingivalis* contém um componente chamado de lipídeo A, que é um glicofosfolipídeo constituído por cadeias de ácidos graxos que participam dos mecanismos de patogenicidade das células bacterianas (Ogawa, 1993; Kumada *et al.*, 1995).

Recentes estudos têm demonstrado que o LPS de *P. gingivalis* liga-se às células através de receptor tipo “Toll like” 2 (TLR) (Hirschfeld *et al.*, 2001), enquanto o lipídeo A liga-se através do TLR 4 (Ogawa *et al.*, 2002) ou mesmo ambos (Darveau *et al.*, 2004). Estes dados conflitantes podem ser explicados devido à heterogeneidade da estrutura decorrente da substituição nas cadeias de ácidos graxos (Kumada *et al.*, 1995).

Grandes avanços têm sido alcançados na compreensão de doenças inflamatórias ósseas a partir da descoberta de um dos mais importantes fatores de ativação de osteoclastos, o RANKL e seu receptor RANK. O RANKL é um potente indutor de osteoclastogênese, ligando-se ao receptor RANK presente na superfície de células precursoras induzindo e ativando a osteoclastogênese (Wittrant *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstraram que a fração lipídica F24 de *P. gingivalis* foi capaz de induzir osteoclastogênese de forma bastante semelhante ao RANKL, e que, em algumas linhagens celulares como monócitos de sangue de camundongos, esta fração foi muito mais eficaz que o próprio RANKL. O mesmo ocorreu na linhagem celular MOCP-5 que não expressa RANK constitutivamente, a F24 teve um efeito indutor de osteoclastogênese maior que o RANKL.

Um dado interessante revelado, foi que mesmo com a adição de osteoprotegerina (OPG), que bloqueia a ligação e diferenciação de células precursoras ligando-se ao RANKL, ao meio de cultura juntamente com a F24, não foi observada redução significativa de osteoclastos. A OPG é um recém caracterizado membro da superfamília dos receptores TNF, produzida por diferentes linhagens celulares, tais como células do estroma medular

ósseo e osteoblastos (Wittrant *et al.*, 2004). Estes dados em conjunto, nos sugeriram que a fração lipídica em estudo utilizaria um receptor distinto do RANK para promover a ativação e diferenciação de osteoclastos.

Uma teoria para explicar o fato da fração induzir a osteoclastogênese, foi a possibilidade de as células estarem sendo induzidas a produzir citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Porém, o que observamos, foi que a fração lipídica não induziu a produção significativa de nenhuma das três citocinas estudadas, sendo insuficiente para induzir a osteoclastogênese.

O TNF- α tem sido detectado em altos níveis em lesões periodontais (Stashenko *et al.*, 1991, Gorska *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) e no fluido gengival de pacientes com doença periodontal (Engebretson *et al.*, 1999). Tem sido relatado que o TNF- α esta envolvido na migração de leucócitos aos tecidos periodontais, na reabsorção óssea alveolar, na perda de inserção conjuntiva e estimulando a produção local de quimiocinas que por sua vez, atuam na manutenção e/ou amplificação da reação inflamatória (Graves *et al.*, 1998; Delima *et al.*, 2001; Graves *et al.*, 2001; Garlet *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que o TNF- α é responsável pela estimulação de células osteoclásticas *in vitro* (Thomson *et al.*, 1987) e *in vivo* (König *et al.*, 1988). Esta citocina tem seu efeito sobre a osteoclastogênese ativando o NF- κ B.

Osteoclastos induzidos por TNF- α mostraram capacidade de formar lacunas de reabsorção em discos de dentina, apenas na presença de IL-1 α . Assim, o TNF- α juntamente com a IL-1 desempenham um papel importante na reabsorção óssea durante doenças inflamatórias (Kobayashi *et al.*, 2000). Assim como o TNF- α , a IL-1 inicia a cascata de sinalização que culmina na ativação do fator NF- κ B e da JNK. A importância da IL-1 em patologias ósseas é demonstrada em estudo que utilizou droga antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra), diminuindo a reabsorção óssea em pacientes acometidos de artrite reumatóide (Bresnihan *et al.*, 1998).

O principal papel da IL-6 sobre o tecido ósseo é a promoção da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (Kotake *et al.*, 1996). Porém, o efeito desta citocina está intimamente ligado a IL-1, ao TNF e ao paratormônio (PTH). Foi observado que a IL-6 induz a liberação de IL-1 e, com a adição de anti-IL-1, foi possível inibir a formação de osteoclastos induzido por IL-6 (Kuhihara *et al.*, 1990). A IL-6 aumenta o efeito de TNF (Devlin *et al.*, 1998) e

intensifica a ação do PTH, aumentando o número de células precursoras e a diferenciação em osteoclastos maduros (De la Mata *et al.*, 1995). Deste modo, nossos dados apontam para a possibilidade da indução dos osteoclastos ser mediada pela F24, independentemente de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

O resultado do sequenciamento protéico mostrou que a molécula receptora da F24 era nucleolin. Esta molécula é primariamente conhecida como uma proteína citoplasmática e nuclear, porém, estudos recentes têm demonstrado que esta proteína também é encontrada na membrana celular (Said *et al.*, 2002; Sinclair & O'Brien, 2002), o que está de acordo com resultados por nós obtidos. Esta proteína é composta de 707 aminoácidos (Lapeyre *et al.*, 1987), porém, devido ao alto conteúdo de aminoácidos carregados negativamente na porção amino-terminal, a nucleolin é separada em gel de SDS com uma massa aparente de 105 kDa, embora a atual massa molecular calculada seja de 77 kDa (Srivastava *et al.*, 1984).

Tem sido reportado que a nucleolin possui afinidade por algumas proteínas ribossômicas, sugerindo que esta proteína pode ser importante na união das subunidades ribossômicas (Bouvet *et al.*, 1998), na transcrição do RNA ribossômico e na organização da cromatina (Srivastava & Pollard 1999). Embora a nucleolin esteja localizada predominantemente no núcleo, tem sido encontrada na forma fosforilada na superfície celular de diferentes linhagens celulares. Ligações específicas de lipoproteína presentes em células HepG2 são mediadas pela nucleolin (Jordon *et al.*, 1994). Esta proteína também serve como ligante da superfície de células HeLa (Semenkovich *et al.*, 1990). A expressão de nucleolin na superfície celular aparentemente está relacionada com o crescimento e a atividade metabólica das células, sendo uma molécula útil como marcadora de proliferação celular em estudos que utilizam linhagens cancerígenas (Roussel & Hernandez-Verdun, 1994; Sirri *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 2003).

Outra função atribuída a nucleolin é a intermediação da ligação de vírus às células. Infecções virais em células hospedeiras dependem primariamente da ligação dos vírus à proteínas específicas da superfície celular. Recentemente, foi demonstrado que a nucleolin interage com antígeno de vírus de hepatite delta, além de modular sua replicação (Lee *et al.*, 1998). Tem sido sugerido também, que a nucleolin pode ser um receptor em potencial

para a ligação do HIV devido a sua capacidade de interagir com a alça V3 da proteína de superfície gp 120 (Callebaut *et al.*, 1998).

É sabido que o M-CSF é necessário para indução da expressão de RANK na superfície de células de medula óssea (Felix *et al.*, 1990). Esta molécula se liga ao receptor c-Fms em células precursoras permitindo a ativação e a maturação de osteoclastos (Teitelbaum *et al.*, 2000). De acordo com nossos resultados, aparentemente, esta molécula também é capaz de promover o aumento da expressão de nucleolin na superfície destas células, o que pode contribuir para uma elevação no número de osteoclastos.

Como foi possível observar nos ensaios de diferenciação das células que expressam nucleolin na superfície e nos ensaios utilizando microscopia confocal, a F24 se liga inicialmente a nucleolin, porém, não penetra na célula, utilizando, possivelmente, este receptor como transmissor de informação. As proteínas intracelulares utilizadas foram posteriormente analisadas. Nossos dados são os primeiros a sugerir um papel de ativador de osteoclasto para a nucleolin.

As quinases de ativação mitogênica (MAPK) são algumas das principais moléculas associadas à ativação celular. Têm sido descritas três diferentes moléculas de MAPK em mamíferos, incluindo ERK1/2, p38 e JNK (Widmann *et al.*, 1999). Nosso trabalho demonstrou que ambos os ativadores utilizados, F24 e RANKL, foram capazes de fosforilar com forte intensidade a MAP quinase ERK1/2. As duas outras moléculas, p38 e JNK, foram fosforiladas com uma intensidade menor por ambas as substâncias testadas. Estes resultados estão de acordo com relatos da literatura, que demonstram atividade oposta das proteínas da MAP quinase quando estimuladas com RANKL. Quando ocorre fosforilação da ERK1/2 desencadeia-se uma supressão da fosforilação da p38 e vice-versa (Hotokezaka *et al.*, 2002).

As MAP quinases, encontradas em todos os eucariotos, são componentes comumente encontrados nas vias de transdução de sinal da membrana ao núcleo (Cobb, 1999; Lewis *et al.*, 1998). Estas quinases são ativadas através de uma cascata composta de várias outras quinases que promovem uma dupla fosforilação no resíduo de tirosina e treonina. As ERK1/2 estão particularmente associadas com proliferação celular, porém, desempenham importantes funções em muitos outros eventos, incluindo seu envolvimento na produção de insulina em células pancreáticas (Cobb, 1999; Lewis *et al.*, 1998).

O segundo subgrupo de MAP quinases, a JNK, exerce sua atividade ligando-se e fosforilando o sítio N-terminal da c-Jun (Hibi *et al.*, 1993). Estas enzimas são ativadas por luz ultravioleta, antibióticos, citocinas e outros fatores de estresse ambiental (English *et al.*, 1999). As JNK são importantes na biossíntese de citocinas e estão envolvidas na transformação celular, respostas ao estresse e apoptose (Kyriakis & Avruch, 1996).

O subgrupo p38 foi descoberto como sendo uma fosfoproteína de tirosina induzida por LPS, sendo um alvo em potencial para ação de drogas que inibam a síntese de TNF- α induzida por LPS (Lee *et al.*, 1994). Assim como a JNK, estas enzimas são freqüentemente ativadas pelo estresse celular (English *et al.*, 1999). Uma vez que a F24 é um lipídeo, esta pode ser uma das razões pela qual também ocorreu fosforilação intensa do p38 nos minutos iniciais, quando comparada com a ocorrida na presença de RANKL.

De acordo com nossos resultados, a F24 fosforila a via src após 30 minutos de incubação com as células RAW264.7, entretanto, não foi possível observar o mesmo resultado nos demais grupos testados. Tem sido relatado que após a estimulação por RANKL, as células osteoclásticas fosforilam a src (Teitelbaum, 2000). Porém, um dos motivos que podem explicar a não fosforilação desta proteína é o tempo de incubação, visto que são necessárias 24 horas após o início da estimulação por RANKL para que a src seja fosforilada (Kumagai *et al.*, 2004). Foi demonstrado que a proteína src se liga a TRAF6 e permite a sinalização mediada por RANK através da fosforilação da PI(3)K. Isto está de acordo com nossos resultados, pois quando estimulamos as células com F24 e a TRAF6 foi bloqueada pelo RNAi, observamos uma queda no número de osteoclastos.

Resultados publicados por Felsenfeld *et al.* (1999), sugerem que uma das funções da Src em células osteoclásticas pode ser de uma molécula adaptadora, recrutando outras proteínas que são necessárias para a modulação das integrinas do citoesqueleto, da adesão celular e migração. Além disso, existem outras evidências que indicam que a atividade da Src quinase é necessária para que a reabsorção óssea seja normal (Missbach *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 2000; Xing *et al.*, 2001). Com relação a via de sinalização que modula a diferenciação osteoclástica, a Src desempenha um papel fundamental nestes mecanismos. A importância desta quinase é refletida no fenótipo osteopetrótico, porém sem nenhuma aparente alteração funcional ou morfológica em outros tecidos, como demonstrado em camundongos src *knockout* (Miyazaki *et al.*, 2004). Já em outros tecidos, o src é substituído

adequadamente por quinases redundantes relacionadas (lyn, fyn, sim, fgr, e hck) de modo a suprimir o src. Estudo realizado por Recchia *et al.* (2004), demonstrarou *in vitro*, que o uso de um inibidor seletivo de Src inibiu a capacidade de reabsorção osteoclástica e a diferenciação das células em osteoclastos, além de prejudicar a habilidade de adesão e a organização do anel de actina nestas células, e de induzir a morte celular em osteoclastos maduros.

Na tentativa de elucidar qual molécula adaptadora seria utilizada na transdução de sinais para ativação e maturação de osteoclastos, testamos duas importantes moléculas, a TRAF6 e a Syk tirosino quinase. Para tanto, utilizamos o RNAi, uma técnica que tem se mostrado extremamente versátil na pesquisas biomédicas, podendo ser utilizado em experimentos de silenciamento pontual de genes ou ser adaptado para estudos em larga escala de genômica funcional, podendo, inclusive, ser utilizado como meio de terapia gênica. A inativação de genes por bloqueio da tradução de seus transcritos (silenciamento) constitui uma estratégia extremamente poderosa tanto para atribuir função aos genes como para mapear a inter-relação dos diferentes componentes das vias regulatórias intracelulares.

Os resultados de nossos experimentos mostraram que as células RAW264.7 transfectadas com TRAF6-RNAi e posteriormente estimuladas com F24 e RANKL, tiveram uma redução significativa no número de osteoclastos maduros (Newman-Keuls, $p < 0.01$) em decorrência da expressão de RNAm desta molécula estarem diminuídas. O primeiro passo na sinalização do RANK é a ligação deste receptor à porção citoplasmática conhecida de TRAFs (Hsu *et al.*, 1999). A TRAF6 é considerada uma molécula adaptadora chave, que reúne proteínas adaptadoras que agem diretamente na expressão gênica de osteoclastos (Boyle *et al.*, 2003). Animais *knockout* TRAF6 apresentavam fenótipo de ossos osteopetrosos devido a incompetência das células precursoras em desenvolverem-se em osteoclastos (Lomaga *et al.*, 1999).

Por outro lado, com a transfecção do Syk-RNAi foi possível observar que apenas as células estimuladas com a fração lipídica F24 demonstraram uma expressiva redução (concentrações de 1 e 10 μg) nos números de osteoclastos maduros. A porção citoplasmática DAP12 e FcR γ , pertencentes às moléculas consideradas co-receptores de osteoclastos (OSCAR e TREM-2) possuem um receptor de ativação de tirosina, que recruta a Syk tirosina quinase (McVicar *et al.*, 1998). Células de medula óssea de camundongos

DAP12^{-/-} e FcR γ ^{-/-} não são capazes de diferenciar-se em osteoclastos multinucleados, além de apresentarem osso osteopetrótico. Células precursoras provenientes de camundongos Syk^{-/-} também não conseguem se diferenciar, indicando que a fosforilação do receptor de tirosina recrutado pelo Syk é fundamental para a osteoclastogênese (Mócsai *et al.*, 2004). Entretanto, nossos resultados demonstram que o RANKL não utiliza esta via como sendo a principal para a diferenciação de osteoclastos, uma vez que a diminuição no número de osteoclastos foi pequena. Entretanto, as células estimuladas com a F24 tiveram uma significativa redução quando a Syk foi bloqueada, indicando que esta pode ser uma outra molécula que atua na sinalização intracelular mediada pela nucleolin.

De acordo com os resultados obtidos nestes experimentos envolvendo RNAi, podemos observar que esta técnica possui diversas vantagens e mostrou-se eficiente em diminuir a expressão protéica das moléculas testadas, permitindo analisar a importância de proteínas específicas na sinalização intracelular.

A natureza multifuncional da nucleolin pode estar ligada a seus domínios especializados para as diferentes atividades. Esta nova molécula identificada como sendo uma das proteínas responsáveis pela ativação da osteoclastogênese, pode ser uma nova ferramenta no estudo de doenças inflamatórias ósseas como artrite reumatóide, osteoporose, doença periodontal entre outras, podendo ser um novo alvo para a ação de drogas.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos afirmar:

1. O lipídeo F24, uma fosfo-di-etanolamina, sintetizado pelas *P. gingivalis*, pode ser considerado um fator de virulência bacteriano que pode estar envolvido na patogênese da doença periodontal;
2. O lipídeo F24 mostrou-se eficaz na indução da osteoclastogênese, independentemente do RANKL;
3. O lipídeo isolado de *P. gingivalis* utiliza a molécula nucleolin como receptor de indução de osteoclastogênese;

Referências Bibliográficas

1. Asai Y, Hirokawa Y, Niwa K, Ogawa T. Osteoclast differentiation by human osteoblastic cell line SaOS-2 primed with bacterial lipid A. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 38:71-79.
2. Baker PJ. The role of immune response in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect.* 2000; 2:1181-1192.
3. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001; 409:363-366.
4. Blair HC, Robinson LJ, Zaidi M. Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 18;328:728-738.
5. Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem.* 1998; 273:19025-19029.
6. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423:337-342.
7. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:2196-2204.
8. Callebaut C, Blanco J, Benkirane N, Krust B, Jacotot E, Guichard G, Seddiki N, Svab J, Dam E, Muller S, Briand JP, Hovenessian AG Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells. *J Biol Chem.* 1998; 273:21988-21997.
9. Cappellen D, Luong-Nguyen NH, Bongiovanni S, Grenet O, Wanke C, Susa M. Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFkappa B. *J Biol Chem.* 2002; 277:21971-21982.
10. Chambers TJ, Thomson BM, Fuller K. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci,* 1984; 66:383-399.
11. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001; 410:37-40.

12. Chiang CY, Kyritsis G, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1999; 67:4231–4236.
13. Chiou W-F, Tsai H-R, Yang L-M, Tsai W-J. C5a differentially stimulates the ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation through independent signaling pathways to induced chemotactic migration in RAW264.7 macrophages. *Int Immunopharmacology.* 2004; 4:1329-1341.
14. Christian S, Pilch J, Akerman ME, Porkka K, Laakkonen P, Ruoslahti E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol.* 2003; 163:871-878.
15. Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization in human periodontal disease: an illustrated tutorial selected ultrastructural and ecologic considerations. *Scanning Microsc* 1990; 4:675-690.
16. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71:479-500.
17. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176:2137-2142.
18. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273:20551-20555.
19. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004; 72:5041-5051.
20. de la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest.* 1995; 95:2846-2852.
21. Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves DT. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28:233-240.

22. Devlin RD, Reddy SV, Savino R, Ciliberto G, Roodman GD. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)₂D₃, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:393-399.
23. Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, di Giovine FS, Kornman KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1999; 70:567-573.
24. English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu Shuichan, Cobb MH. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* 1999; 253:255-270.
25. Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 1990; 127:2592-2594
26. Felsenfeld DP, Schwartzberg PL, Venegas A, Tse R, Sheetz MP. Selective regulation of integrin--cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol.* 1999; 1:200-206.
27. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-811.
28. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997; 11:3482-3496
29. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinase, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:671-679.
30. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect.* 2005; 7:738-747.

31. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35:21-41.
32. Gilbert P, Evans DJ, Brown MR. Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*. *J Appl Bacteriol* 1993; 74: 67S-78S.
33. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30:1046-1052.
34. Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 1998; 69:1419-1425.
35. Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, Kakouras A, Jiang Y. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res*. 2001; 80:1875-1879.
36. Green FA. Binding of phosphatidylcholine-¹⁴C to glass. *J Lipid Res* 1969; 10:710-711.
37. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*. 1994; 266:443-448
38. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999; 286:950-952
39. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein – and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7:2135-2148
40. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*. 2001; 69:1477-1482.
41. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas*

- gingivalis*. Periodontol 2000. 1999; 20:168-238.
42. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. J Biol Chem 2002; 277:47366-47372.
 43. Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. Infect Immun. 2000; 68:4681-4687.
 44. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:3540-3545.
 45. Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, Suda K, Li X, Takami M, Okahashi N, Nishihara T, Takahashi N. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. J Immunol. 2003; 170:3688-3695.
 46. Jordon P, Heid H, Kinzel V, Kubler D. Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. Biochemistry 1994; 33:14696-14706.
 47. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of *sense* vs. *antisense* constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. Plant Mol Biol. 1996; 31:957-973.
 48. Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. J Immunol. 2000; 164:2102-2109.
 49. Kawai Y, Yano I, Kaneda K. Various kinds of lipoamino acids including a novel serine-containing lipid in an opportunistic pathogen *Flavobacterium*. Their

- structures and biological activities on erythrocytes. *Eur J Biochem.* 1988; 171:73-80.
50. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142:5050-5055.
51. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, Yamamoto G, Hishikawa T, Noguchi T, Yoshikai Y. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol.* 2001; 166:3574-3579.
52. Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med.* 2002; 195:201-209.
53. 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 TJ, Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000; 191:275-286.
54. Kobayashi Y, Mizoguchi T, Take I, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N. Prostaglandin E₂ enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1. *J Biol Chem.* 2005; 280:11395-11403.
55. Kolebrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; *J Bacteriol* 175:3247-3252.
56. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999; 397:315-323.
57. Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [³H]tetracycline excretion from prelabeled mice. *J Bone Miner Res.* 1988; 3:621-627.
58. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A,

- Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res.* 1996; 11:88-95.
59. Kumada H, Haishima Y, Umemoto T, Tanamoto K. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 1995; 177:2098-2106.
60. Kumagai N, Ohno K, Tameshige R, Hoshijima M, Yogo K, Ishida N, Takeya T. Induction of mouse c-src in RAW264 cells is dependent on AP-1 and NF- κ B and important for progression to multinucleated cell formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325:758-768.
61. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol.* 1990; 144:4226-4230.
62. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascade activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 1996; 271:24313-24316.
63. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93, 165-176.
64. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62:1244-63.
65. Lapeyre B, Bourbon H, Amalric F. Nucleolin, the major nucleolar protein of eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:1472-1476.
66. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; 372:739-746.
67. Lee CH, Chang SC, Chen CJ, Chang MF. The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting. *J Biol Chem.* 1998; 273:7650-7656.

68. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascade. *Adv Cancer Res.* 1998; 74: 49-139.
69. Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988; 67:1131–1135.
70. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* 2003; 11:17-21.
71. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 1999; 13:1015-1024.
72. McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, Geahlen RL, Nakamura MC, Linnemeyer P, Seaman WE, Anderson SK, Ortaldo JR, Mason LH. DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1998. 273:32934-32942.
73. Minamino M, Sakaguchi I, Naka T, Ikeda N, Kato Y, Tomiyasu I, Yano I, Kobayashi K. Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology.* 2003; 149:2071-2081.
74. Missbach M, Jeschke M, Feyen J, Muller K, Glatt M, Green J, Susa M. A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption *in vitro* and in rodent models *in vivo*. *Bone.* 1999; 24:437-449.
75. Miyauchi M, Sato S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, Zhao M, Takata T. Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol.* 2001; 116:57–62.
76. Miyazaki T, Takayanagi H, Isshiki M, Takahashi T, Okada M, Fukui Y, Oda H, Nakamura K, Hirai H, Kurokawa T, Tanaka S. *In vitro* and *in vivo* suppression of osteoclast function by adenovirus vector-induced csk gene. *J Bone Miner Res.* 2000; 15:41-51.

77. Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem.* 2004 23;279:17660-17666.
78. Mizuno A, Kanno T, Hoshi M, Shibata O, Yano K, Fujise N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Tsuda E, Murakami A, Yasuda H, Higashio K. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2002; 20:337-344.
79. Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JAG, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:6158-6163.
80. Mohamed SGK, Sugiyama E, Shinoda K, Hounoki H, Taki H, Maruyama M, Miyahara T, Kobayashi M. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced expression of NFATc1 and c-fos: a possible mechanism for downregulation of osteoclastogenesis. *Bioch Bioph Res Commun.* 2005; 329:839-845.
81. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, Aramaki M, Mahanonda R, Kojima T, Murakami Y, Saito M, Morotome Y, Ishikawa I. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol.* 2002; 130:338-344.
82. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun.* 1996; 64:2371-2380.
83. Naka T, Fujiwara N, Yano I, Maeda S, Doe M, Minamino M, Ikeda N, Kato Y, Watabe K, Kumazawa Y, Tomiyasu I, Kobayashi K. Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1635:83-92.
84. Nichols FC. Novel ceramides recovered from *Porphyromonas gingivalis*: relationship to adult periodontitis. *J Lipid Res.* 1998; 39:2360-2372.
85. Nichols FC, Levinbook H, Shnaydman M, Goldschmidt J. Prostaglandin E2 secretion from gingival fibroblasts treated with interleukin-1 β : effects of lipid extracts from *Porphyromonas gingivalis* or calculus. *J Periodontal Res.* 2001;

- 36:142-152.
86. Nichols FC, Riep B, Mun J, Morton MD, Bojarski MT, Dewhirst FE, Smith MB. Structures and biological activity of phosphorylated dihydroceramides of *Porphyromonas gingivalis*. *J Lipid Res.* 2004; 45:2317-2330.
 87. Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. *J Dent Res.* 2004; 83:602-607.
 88. Ogawa T. Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 1993; 332:197-201
 89. Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S. Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int Immunol.* 2002; 14:1325-1332.
 90. Recchia I, Rucci N, Funari A, Migliaccio S, Taranta A, Longo M, Kneissel M, Susa M, Fabbro D, Teti A. Reduction of c-Src activity by substituted 5,7-diphenylpyrrolo[2,3-d]-pyrimidines induces osteoclast apoptosis *in vivo* and *in vitro*. Involvement of ERK1/2 pathway. *Bone.* 2004; 34:65-79.
 91. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000; 289:1508-14.
 92. Roussel P, Hernandez-Verdun D. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res.* 1994; 214:465-472.
 93. Said EA, Krust B, Nisole S, Svab J, Briand JP, Hovanessian AG. The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J Biol Chem.* 2002; 277:37492-37502.
 94. Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Ozasa A, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Nakao K. Impaired bone resorption by lipopolysaccharide *in vivo* in mice deficient in the prostaglandin E receptor EP4 subtype. *Infect Immun.* 2000; 68:6819-6825.
 95. Schifferle RE, Wilson ME, Levine MJ, Genco RJ. Activation of serum complement by polysaccharide-containing antigens of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 1993; 28:248-254.

96. Semenkovich CF, Ostlund RE Jr, Olson MO, Yang JW. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry*. 1990; 29:9708-9713.
97. Shibata Y, Muramatsu T, Hirai M, Inui T, Kimura T, Saito H, McCormick LM, Bu G, Kadomatsu K. Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:6788-6796.
98. Sinclair JF, O'Brien AD. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem*. 2002; 277:2876-2885.
99. Sirri V, Roussel P, Trere D, Derenzini M, Hernandez-Verdun D. Amount variability of total and individual Ag-NOR proteins in cells stimulated to proliferate. *J Histochem Cytochem*. 1995; 43:887-893.
100. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979; 6:351-382.
101. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000; 1999:82-121.
102. Socransky SS; Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol* 1992; 63:322-331.
103. Socransky SS; Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38:135-187.
104. Srivastava M, Fleming PJ, Pollard HB, Burns AL. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett*. 1984; 250:99-105.
105. Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role, in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J*. 1999; 13:1911-1922.
106. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol*. 1991; 62:504-509.
107. Stead A, Main JS, Ward ME, Watt PJ. Studies on lipopolysaccharides isolated from strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Gen Microbiol*. 1975; 88:123-131.
108. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*. 1992; 13:66-80.

109. Susa M, Luong-Nguyen NH, Cappellen D, Zamurovic N, Gamse R. Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transl Med.* 2004; 2:6.
110. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology.* 1988; 122:1373-1382.
111. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256:449-55.
112. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* 2002; 3:889-901.
113. Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene.* 1997; 204:35-46.
114. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000; 289:1504-1508
115. Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP, Penninger JM. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest.* 2000; 106:59-67.
116. Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14:237-252.
117. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol.* 1987; 138:775-779.
118. Valverde P, Kawai T, Taubman MA. Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res.* 2004; 19:155-164.
119. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates

- expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*. 2004; 35:629-635.
120. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305:970-973.
121. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. 1999; 79:143-180.
122. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res*. 1996; 31:393-407.
123. Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Redini F. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1704:49-57
124. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995; 270:1326-1331.
125. Xing L, Venegas AM, Chen A, Garrett-Beal L, Boyce BF, Varmus HE, Schwartzberg PL. Genetic evidence for a role for Src family kinases in TNF family receptor signaling and cell survival. *Genes Dev*. 2001; 15:241-253.
126. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takawashi, N., and Suda, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:3597-3602.
127. Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaja M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y, Wu H. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*. 2002; 418:443-447.
128. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D., and Nishikawa, S. The murine mutation osteopetrosis is in

the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 345: 442-444.

129. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000; 101:25-33.