

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de pós-graduação em microbiologia

Thales Augusto Anestino

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A INFECÇÃO PELO VÍRUS
CHIKUNGUNYA E A DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL
INDUZIDA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte
2024

Thales Augusto Anestino

Estudo da relação entre a infecção pelo vírus *Chikungunya* e a doença periodontal experimental induzida em camundongos

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza

043

Anestino, Thales Augusto.

Estudo da relação entre a infecção pelo vírus Chikungunya e a doença periodontal experimental induzida em camundongos [manuscrito] / Thales Augusto Anestino. – 2024.

70 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra Mila Fernandes Moreira Madeira. Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Doenças Periodontais. 4. Artrite Reumatoide. I. Madeira, Mila Fernandes Moreira. II. Souza, Danielle da Glória de. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **THALES AUGUSTO ANESTINO**

Nº REGISTRO:

Às 09:00 horas do dia **17 de dezembro de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Sandra Yasuyo Fukada Alves (Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto), Thiago Moreno Lopes e Souza (Fundação Oswaldo Cruz, Presidência da Fiocruz, Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde.), Tarcília Aparecida da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Departamento de Clínica), Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira (Orientadora) e a Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza (Coorientadora). para julgar o trabalho final "**Estudo da relação entre a infecção pelo vírus Chikungunya e a doença periodontal experimental**" do aluno **Thales Augusto Anestino**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerada **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2024

Membros da Banca:

Profa. Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis

Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves

Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

De acordo:

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira

(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Yasuyo Fukada Alves, Usuário Externo**, em 18/12/2024, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 18/12/2024, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mila Fernandes Moreira Madeira, Professora do Magistério Superior**, em 18/12/2024, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tarcília Aparecida da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 18/12/2024, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3777083 e o código CRC A8F756A4.

Aos meus queridos e amados avós (Otávio, Ephigênia) e mãe (Juliana), que sempre estiveram ao meu lado. Muito obrigado por todo suporte, incentivo e amor. Amo vocês para todo o sempre.

Agradecimentos

A Nzambe, Nzila, Kitembo e todos os guias espirituais, que estão sempre presentes na minha vida sempre me protegendo, guardando e me guiando pelo melhor caminho com muito amor e sabedoria.

As professoras Mila e Danielle, pela paciência, suporte e orientação. Pontos essenciais para que eu pudesse superar os desafios diários. Agradeço também pela convivência, a qual foi rica em ensinamentos e aprendizagem, sendo estes importantes fatores para o meu amadurecimento e enriquecimento tanto profissional quanto pessoal. Obrigado por me mostrarem como ser um profissional qualificado e competente.

A professora Danielle, ainda agradeço por ter me recebido com tanto carinho no laboratório, pelos ensinamentos, histórias.

Ao pequeno e grande grupo “Periodontal club”, por cada reunião, cada discussão, cada tarde que passamos juntos enriquecendo e solidificando cada vez mais os nossos conhecimentos. Que este grupo cresça cada vez mais!

Aos meus grandes amigos e companheiros de laboratório, a presença de vocês foi e é indispensável. Obrigado pelas tantas risadas, polêmicas, conselhos e passeios. Vocês são extremamente especiais pra mim. Anna, Amanda, Barbara, Brenda, Camila, Carla, Carlos, Cinthia, Fran, Gabi, Ian, Jô, Livia, Maria Eduarda, Marianas, Matheus, Micheli, Pedro, Rafael, Rafaela, Renan, Samantha, Thai, Vidy e Victors. Vocês são icônicos! Adoro vocês!

Um agradecimento especial aos meus grandes companheiros de bancada Anna, Amanda, Livia e Pedro sem vocês eu nem sei o que seria de mim. Vocês foram de grande importância não só para o desenvolvimento dessa tese, mas também para meu crescimento como pessoa e colega de trabalho. Muito obrigado pelo auxílio nos experimentos, pelas risadas tornando os dias de trabalho mais leves. Muito obrigado por tudo!

Aos colegas e professores do grupo Imunofar, obrigado pela constante convivência, no lab e nos momentos de descontração. Obrigado pela ajuda nos diversos momentos durante o desenvolvimento desse projeto. Vocês tornam o ambiente de trabalho/estudo ainda mais interessante e prazeroso.

Aos cristais Gil e Frank por me proporcionarem as melhores manhãs. Obrigado também por sempre estarem dispostas a nos ajudar e pelo imenso carinho e maravilhosa convivência que tivemos ao longo desses dois anos. Vocês são maravilhosas!

As agências de fomento, CAPES, CNPq, INCT em Dengue e FAPEMIG (APQ- 01790-22) pelo suporte financeiro.

Aos meus melhores amigos Adrielly, Fabiana, Isabele, Rafaela, Jeferson e Marcos obrigado pela amizade de vocês, pelas alegrias e risadas. Vocês na verdade são meus irmãos de alma, parte da minha família. Amo todos vocês.

Aos familiares por todo carinho e amor. Em especial minhas tias Regina, Luciana e minha prima Larissa por serem mulheres maravilhosas na minha vida e sempre me ajudarem nos momentos mais difíceis me dando amor e apoio. Eu amo muito vocês.

Ao meu zelador de Nkise Tatetu Njiramavulê e meus irmãos de santo da família Inzo Nganga Kiua Nzila, em especial, meu pai criador Kytalamaze, minha irmã de barco Yandamaza, e meus irmãos Kymguambe, Kitulomolenge, Lumuanza, Muzanjile, Makota Cida, Patricia, Ytakyande, Kayakilunde, Muanangue, Bandakinibu, Dani, Diego e Sofia por todo suporte, cuidado, carinho e parceria. Por tonarem meu caminho mais dinâmico e leve. Nzambe nkuatesa! (obrigado!).

Resumo

Chikungunya virus (CHIKV) pertence ao gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* e possui genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva. Estudos mostram que micro-organismos como o CHIKV podem estar associados a condições artríticas, podendo resultar em sintomatologias como dor e rigidez articular. A infecção por CHIKV leva a um acometimento sistêmico, podendo ser também observadas alterações bucais como sangramento e perda óssea alveolar, resultando na instabilidade de dentes, que são características da doença periodontal (DP). A DP é uma doença inflamatória de etiologia infecciosa que pode acometer a gengiva, o osso alveolar e o ligamento periodontal. Além disso, a manutenção do processo inflamatório periodontal pode induzir a translocação de bactérias da cavidade bucal para sítios extra bucais, relacionando a DP a diferentes processos patológicos incluindo a artrite reumatoide (AR). Apesar de a DP ser considerada importante na patogênese da AR, a relação entre a DP e condições artríticas como as induzidas por CHIKV ainda necessita de maiores esclarecimentos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos nas alterações periodontais associadas à infecção por CHIKV, em camundongos. Para isso, camundongos C57BL/6 receberam um inóculo contendo 1×10^6 UFP/mL de CHIKV no coxim plantar direito. Após a eutanásia, os tecidos periodontais foram coletados em diferentes tempos experimentais para análise de perda óssea alveolar, avaliação histopatológica e avaliação da produção de mediadores inflamatórios. Nossos resultados mostram que a infecção via intraplantar por CHIKV induziu reabsorção óssea alveolar associada ao aumento de osteoclastos na crista óssea alveolar dos camundongos. Entretanto, essa perda óssea alveolar não está associada à osteoclastogênese induzida por CHIKV, pois foi observado que CHIKV não induziu a formação de osteoclastos, interferindo diretamente na osteoclastogênese. Sendo assim, nossos resultados mostram que a perda óssea alveolar induzida por CHIKV depende da inflamação periodontal, uma vez que é observado aumento de mediadores inflamatórios, como CCL2, IFN γ , RANKL e IL6. Menor produção de OPG em tempos tardios e desbalanço na relação RANKL:OPG. Além disso, fibroblastos gengivais produzem IL6 quando infectados com CHIKV e que, na ausência desse mediador, camundongos infectados com CHIKV não apresentaram perda óssea alveolar. Além disso, foram observadas alterações na microbiota bucal induzidas por CHIKV e não foi observada perda óssea alveolar em camundongos *germ-free* ou tratados com clorexidina (CHX), mostrando o papel fundamental da microbiota bucal neste contexto. Sendo assim, a infecção intraplantar de CHIKV está associada à indução de um processo inflamatório periodontal, alterações na microbiota bucal, que, por sua vez, gera um

desbalanço na razão RANKL:OPG culminando no aumento de osteoclastos presentes na crista óssea alveolar e na perda óssea alveolar observada.

Palavras chave: vírus Chikungunya; doença periodontal; osteoclastos; fibroblastos; microbiota.

Abstract

The *Chikungunya virus* (CHIKV) belongs to the genus *Alphavirus*, of the *Togaviridae* family and has a single-stranded RNA genome of positive polarity. Studies show that microorganisms such as CHIKV can be associated with arthritogenic conditions, leading to symptoms such as pain and joint stiffness. CHIKV infection causes systemic involvement, and oral changes such as bleeding and alveolar bone loss can also be observed, resulting in dental instability, which are characteristics of periodontal disease (PD). PD is an inflammatory disease of infectious etiology that can affect the gums, alveolar bone, and periodontal ligament. Furthermore, maintaining the periodontal inflammatory process can induce the translocation of bacteria from the oral cavity to extraoral sites, linking PD to different pathological processes including rheumatoid arthritis (RA). Although PD is considered important in the pathogenesis of RA, the relationship between PD and arthritogenic conditions such as those caused by CHIKV still requires further clarification. Thus, this study aimed to evaluate the mechanisms involved in periodontal changes associated with CHIKV infection in mice. For this purpose, C57BL/6 mice were inoculated with 1×10^6 PFU/mL of CHIKV in the right footpad. After euthanasia, periodontal tissues were collected at different experimental time points for analysis of alveolar bone loss, histopathology and evaluation of the production of inflammatory mediators. Our results show that intraplantar CHIKV infection has induced alveolar bone resorption, which was associated with an increased number of osteoclasts in the alveolar bone crest of mice. However, this alveolar bone loss was not related to CHIKV-induced osteoclastogenesis, as it was observed that CHIKV did not induce the formation of osteoclasts, as CHIKV did not directly stimulate osteoclast formation. Therefore, our results show that the CHIKV-induced alveolar bone loss depends on periodontal inflammation, since an increased production of inflammatory mediators was observed, such as CCL2, IFN γ , RANKL and IL-6, along with reduced OPG production at later times and an imbalance in the RANKL:OPG ratio. Furthermore, gingival fibroblasts produced IL-6 when infected with CHIKV and, in the absence of IL-6, CHIKV-infected mice did not show alveolar bone loss. Changes in the oral microbiota induced by CHIKV were also observed, and no alveolar bone loss was observed in germ-free mice or mice treated with chlorhexidine (CHX), highlighting the critical role of the oral microbiota in this context. In conclusion,

intraplantar CHIKV infection is associated with the induction of periodontal inflammation, changes in the oral microbiota, which, in turn, lead to an imbalance in the RANKL:OPG ratio, culminating in increased amount of osteoclasts in the alveolar bone crest and induction of alveolar bone loss.

Keywords: *Chikungunya virus*; periodontal disease; osteoclasts; fibroblasts; microbiota.

Lista de figuras

Figura 1. Ciclos de transmissão de CHIKV.	19
Figura 2. Virion de CHIKV.	20
Figura 3. Ciclo de multiplicação de CHIKV.	22
Figura 4. Protocolos experimentais.	33
Figura 5. Cinética de recuperação viral no soro, tecidos periodontais de camundongos C57BL6 WT	39
Figura 6.. Cinética de perda óssea alveolar em camundongos WT.....	40
Figura 7.Quantificação de células TRAP em camundongos WT infectados com CHIKV.	41
Figura 8.Cinética de produção de RANKL, OPG e razão RANKL:OPG nos tecidos periodontais e no soro de animais WT.....	41
Figura 9. Avaliação da infecção em células RAW 264.7 e osteoclastos.....	43
Figura 10. Avaliação da infecção na osteoclastogênese	44
Figura 11. Cinética de produção de mediadores inflamatórios nos tecidos periodontais em camundongos WT	45
Figura 12. Avaliação da infecção em fibroblastos bucais murinos in vitro.....	46
Figura 13. Análise de título viral na pata e cinética de hipernocicepção em animais WT e <i>Il6r^{-/-}</i>	47
Figura 14. Análise de perda óssea alveolar em animais WT e <i>Il6r^{-/-}</i> d.p.i.	47
Figura 15. Análise da microbiota bucal na infecção por CHIKV	49
Figura 16. Análise de alterações periodontais em animais submetidos a aplicação tópica por CHX.....	50

Lista de abreviaturas e siglas

μL- microlitros

ACPAs- Anticorpos antiproteínas citrulinadas

Anti-IgG- Anti-imunoglobulina G

APCs- Células apresentadoras de antígenos

AR- Artrite Reumatoide

BCRJ- Banco de Células do Rio de Janeiro

BFV- *Barmah Forest*

BMC- Células da medula óssea

BOD- Demanda Bioquímica de Oxigênio

CEUA- Comitê de Ética em Utilização Animal

CHIKV- *Chikungunya virus*

CIS- Proteína SH2 induzida por citocina (CIS) e

CMC- Carboximetilcelulose

CO₂- Dióxido de carbono

COA- Crista óssea alveolar

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DP- Doença periodontal

ECSA- Genótipo do leste/centro/sul africano

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROS- Espécies reativas de oxigênio

EUA- Estados Unidos da América

FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

g- Grama

GM-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

H₂O- Água

HEPES- Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico

HLA- antígeno leucocitário humano

IgG- imunoglobulina G

IOL- Linhagem do oceano índico

JCE- Junção cimento-esmalte

LPS- Lipopolissacarídeo

LtxA- Leucotoxina A

M- Mol

MAMPs- Padrões moleculares ligados a micro-organismos

MAYV- *Mayaro virus*

M-CSF- Fator estimulador de colônia de macrófagos

mg- Miligrama

Min- Minutos

mL- Mililitros

mM- Milimol

MMP- Metaloproteinases de matriz

MNPs- Fagócitos mononucleares

NETs- “Armadilhas extracelulares de neutrófilos”

nm- nanômetros

nsPs- Poliproteína não estrutural

°C- Graus Celsius

OD- Densidade óptica

OMVs- Vesículas de membrana externa

ONNV- *O'nyong-nyong virus*

OPG- osteoprotegerina

PBS- *Phosphate buffered saline*

PGE2- Prostaglandina E2

PMN- Polimorfonucleares

RANK- Receptor ativador do fator nuclear κ B

RANKL- Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B

RF- Fatores reumatoides

RNA- Ácido ribonucleico

Rpm- Rotação por minuto

RRV- *Ross River virus*

SFB- Soro fetal bovino

SFV- *Floresta Semliki virus*

SINV- *Sindbis virus*

TLR- *Toll like receptors*/Receptores do tipo *Toll*

TRAP- Fosfatase ácida resistente ao tártaro

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UFP- Unidades Formadoras de Placa

Sumário

1-Introdução	18
1.1- Vírus Chikungunya.....	18
1.6- Relação entre CHIKV e alterações periodontais	24
1.3- Doença periodontal.....	25
1.4- Patogênese da doença periodontal.....	26
1.5- Relação entre artrite e DP.....	29
3.1- Objetivos específicos.....	31
3.1.1- Caracterizar as alterações periodontais induzidas pela infecção por CHIKV;.....	31
4.1- Camundongos.....	31
4.2- Propagação e concentração de <i>Chikungunya virus</i>	31
4.3- Desenho experimental	32
4.4- Avaliação da produção de mediadores inflamatórios por ELISA	33
4.5- Determinação de carga viral	34
4.6- Quantificação de perda óssea alveolar.....	35
4.7- Coloração de TRAP.....	35
4.8- Análise da microbiota bucal por sequenciamento	36
4.9- Avaliação de hipernocicepção	36
4.10- Cultura de osteoclastos	37
4.11- Cultura de fibroblastos	37
4.12- Análises estatísticas	38
5. Resultados.....	38
6. Discussão.....	50
7. Considerações finais.....	55

1- Introdução

1.1- Vírus Chikungunya

O gênero *Alphavirus*, pertencente a família *Togaviridae*, é composto por vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva. Este grupo de vírus também é conhecido como alfavírus do “Velho Mundo”, que inclui *Chikungunya virus* (CHIKV), *O'nyong-nyong virus* (ONNV), *Ross River virus* (RRV), *Barmah Forest virus* (BFV), *Mayaro virus* (MAYV), *Sindbis virus* (SINV) e *Floresta Semliki virus* (SFV) (MOSTAFAVI *et al.*, 2019).

CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1953, durante uma epidemia que ocorreu na Tanzânia. O seu nome deriva-se do dialeto Makonde, que significa “aquele que se curva”, associado à postura de pessoas infectadas que apresentam fortes dores articulares (WEAVER *et al.*, 2013). De acordo com análises filogenéticas, existem 4 genótipos de CHIKV: i) o genótipo do oeste africano isolado do Senegal e Nigéria, ii) o genótipo do leste/centro/sul africano (ECSA) que consiste em outro genótipo enzoótico na África, iii) os isolados na Ásia que estão inseridos no genótipo asiático; e iv) a linhagem do oceano Índico (IOL), o genótipo mais recente. IOL foi responsável por graves epidemias no sudeste asiático e na Índia de 2005 a 2008 (WAHID *et al.*, 2017).

Entre 1952 e 1953 foi identificado o primeiro surto de CHIKV nos distritos de Newala e Masisi, na Tanzânia. Desde a década de 1960, os surtos foram notificados no continente africano e asiático, com alta nas décadas de 1960 a 1980 e diminuição até 2004 (WEAVER, 2014). No ano de 2004 foi observada uma epidemia grave na costa do Quênia e, então, o CHIKV espalhou-se para as ilhas do Oceano Índico, Índia e sudeste Asiático. No ano de 2007 houve pequenos surtos na Europa. Desde 2011, a região do Pacífico apresentou vários surtos e, em 2013, CHIKV apareceu no Caribe e espalhou-se para ilhas vizinhas e para as Américas (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016). Em 2013, CHIKV teve sua emergência anunciada nas Américas, espalhando-se por 45 países, contemplando todas as regiões americanas (Norte, Centro e Sul) (YACTAYO *et al.*, 2016). Em 2014 ocorreu os primeiros casos registrados de CHIKV no Brasil, afetando 47.000 indivíduos naquele ano (SIMIÃO *et al.*, 2019). No ano de 2015, houve 17.971 casos de CHIKV e 14 óbitos confirmados. Já em 2016, houve 151.318 casos e 196 óbitos confirmados (BRASIL- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017). Em 2017 foram registrados 185.593 casos prováveis de febre chikungunya e em 2018 houve 59.584 casos e 33 óbitos confirmados (BRASIL- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018). Em 2022 foram registrados 243.347 e em 2023 foram registrados 143.739 possíveis casos de infecções por CHIKV, sendo que as regiões Sudeste e Norte tiveram maiores registros de casos, com maiores

taxas em Minas Gerais e Pará, respectivamente. Neste mesmo ano foram registrados 82 óbitos por CHIKV, já no ano anterior, o número de óbitos foi de 84 (BRASIL- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2023). Até a semana 26 de 2024, foram registrados 233.225 possíveis casos de CHIKV, sendo a região Sudeste a de maior incidência de casos. Quanto ao número de óbitos, foram registrados 134 no Brasil, a maior parte deles ocorreu na região Sudeste, no estado de Minas Gerais (BRASIL- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2024).

Apesar de CHIKV pertencente à linhagem asiática ter sido o responsável pelos primeiros casos registrados em território nacional (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). Posteriormente, o genótipo ECSA passou a ganhar destaque ao ser identificada como responsável por epidemias associadas ao CHIKV, em grande parte dos estados brasileiros, como no estado do Rio de Janeiro (XAVIER *et al.*, 2019). Além disso, ECSA é responsável pelos casos recentes de infecção por CHIKV em território nacional (2020-2023) (XAVIER *et al.*, 2023).

Trabalho revisto por SILVA JR. *et al.* (2018) mostra que CHIKV possui dois ciclos de transmissão: enzoótico e urbano. O ciclo enzoótico (especialmente na África) envolve a participação de diferentes espécies de *Aedes*, como *Aedes furcifer*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus* e *Ae. fulgens*. Primatas não humanos atuam como reservatórios para CHIKV. No ciclo urbano, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são conhecidos como os principais vetores de CHIKV na África, Ásia, Europa, Oceania e nas Américas (Figura 1).

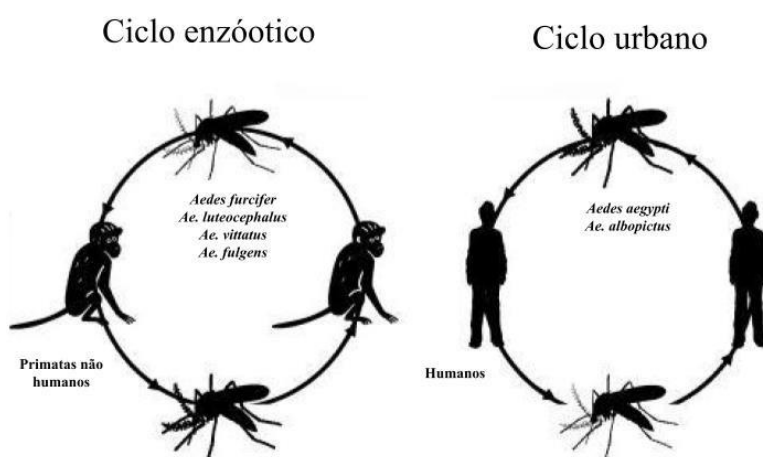


Figura 1. Ciclos de transmissão de CHIKV. CHIKV possui dois tipos de ciclos de transmissão: O enzoótico e o urbano. No ciclo enzoótico, diversas espécies do gênero *Aedes* são vetores e primatas não humanos são

reservatórios. No ciclo urbano são observados como principais vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e o reservatório para o vírus passa a ser os seres humanos. Adaptado de PETERSEN; STRAMER; POWERS, 2010.

CHIKV possui tamanho de aproximadamente 70 nanômetros, um genoma de RNA fita simples de sentido positivo com cerca de 11,800 nucleotídeos, duas janelas abertas de leitura (ORFs) separadas por uma região codificadora e possui regiões não traduzidas (revisto por SILVA; DERMODY, 2017). As ORFs codificam 4 proteínas não estruturais (nsP1, 2, 3 e 4) e 5 proteínas estruturais, como capsídeo (C), envelope (E1 e E2) e 2 peptídeos (E3 e 6K) (revisto por CUNHA; TRINTA, 2017). Um vírion de CHIKV apresenta um genoma envolto por centenas de cópias de proteínas do capsídeo inseridas em uma bicamada lipídica adquirida do hospedeiro, com espículas de glicoproteínas triméricas compostas por três heterodímeros E1 e E2 (revisto por KENDALL *et al.*, 2019). A proteína E3 estabiliza as espículas de heterodímeros e promove o desdobramento e ativação do precursor das proteínas E2, o p62 (revisto por NING *et al.*, 2024) (Figura 2).

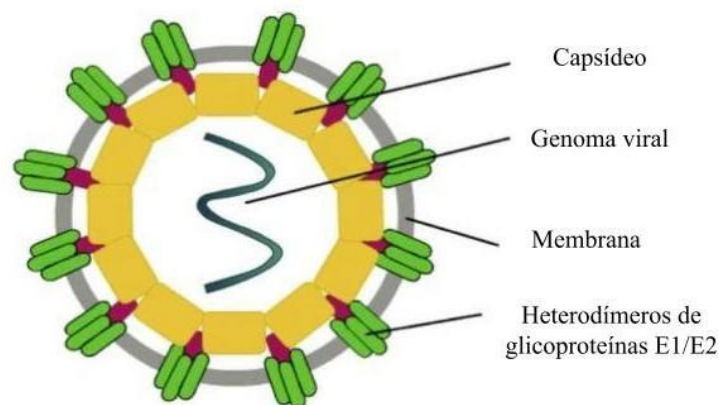


Figura 2. Vírion de CHIKV. CHIKV possui genoma de (+)ssRNA encapsulado por uma capsídeo inseridos em uma bicamada lipídica, que apresenta espículas de heterodímeros de glicoproteínas inseridas em sua estrutura. Adaptado de CASTILLO-MACÍAS *et al.*, 2017.

Os heterodímeros de glicoproteínas são responsáveis pela penetração do vírus nas células hospedeiras, a partir da interação da proteína E2 ao receptor Mxra8, também conhecido como molécula de adesão contendo domínio duplo de imunoglobulina (Ig) (DICAM) presente em diversos tipos de células como mieloides, mesenquimais e epiteliais (ZHANG *et al.*, 2018). Além do Mxra8, outros receptores como glicosaminoglicanos (GAGs), família de imunoglobulina e mucina de células T (TIM), molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN), tirosina quinase do receptor AXL e

complexo de proteína de membrana CD147 também foram descritos como possíveis correceptores associados a adesão de CHIKV em células alvo. Sendo esse processo de adesão à célula ainda não está elucidado (revisto por CONSTANT *et al.*, 2021).

Após adesão à célula hospedeira, o vírus penetra por endocitose pela via dependente de clatrina (revisto por SILVA; DERMODY, 2017). Uma vez dentro do endossoma, o envelope viral torna-se instável pelo pH baixo, liberando o material genético viral no citoplasma celular (revisto por CERVANTES-ACOSTA; VERGARA- SANJUÁN, 2016). Posteriormente, o genoma viral é traduzido a uma poliproteína não estrutural (nsPs) chamada nsPs1234, responsável pela transcrição e replicação do RNA viral. Ao sofrer auto proteólise, origina a proteína intermediária nsPs123 e a proteína madura nsP4, capazes de realizar a síntese de RNA de polaridade negativa (RNA-) e então, nsPs123 sofre, novamente, uma auto proteólise entre as proteínas nsP1 e nsP2, capazes de sintetizar RNAs de polaridade positiva (RNA+) e RNA- devido à sua ação de RNA polimerase. Assim, uma nova proteólise entre nsP2 e nsP3 gera uma RNA polimerase capaz de sintetizar RNA+ (LEUNG; *et al.*, 2009). Após a estabilidade na produção de RNA subgenômico, a proteína C, que interage com o RNA subgenômico, reconhecendo sinais de empacotamento a partículas semelhantes a nucleocapsídeo, com posterior integração de poliproteínas maduras, após a clivagem de E1 e E2. A interação entre a proteína C e E2 impulsiona a formação do envelope com aquisição de uma bicamada de membrana proveniente de células hospedeiras. Então, os vírions são liberados e prontos para uma nova infecção (revisto por LEUNG; NG; CHU, 2011).

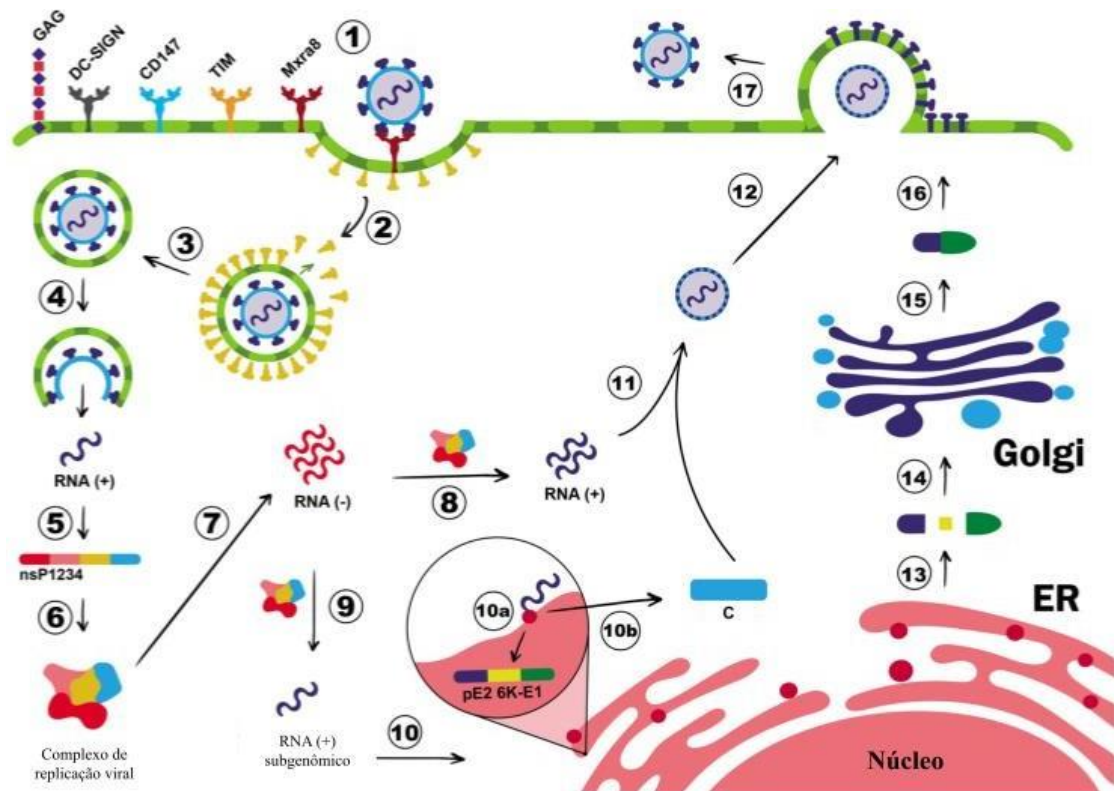


Figura 3. Ciclo de multiplicação de CHIKV. (1) Após interação com receptor da célula hospedeira, o vírus é endocitado por uma via mediada por clatrina (2), posteriormente as moléculas de clatrina se dissociam da vesícula endocítica (3) o baixo pH do endossoma leva a liberação do genoma viral no citoplasma celular (4). Então, dá-se o início da tradução do genoma viral, com a produção da poliproteína não estrutural P1234 (5). A poliproteína sofre clivagem desassociando as proteínas e formando o complexo de replicação viral (6). O complexo de replicação viral é responsável pela síntese de RNA de sentido negativo (7) fita molde para a síntese de RNA de sentido positivo (8), e RNA subgenômico 26S (9). No retículo endoplasmático rugoso ocorre a síntese da poliproteína C-pE2-6K-E1 (10). A proteína C, sofre proteólise se dissociando da poliproteína (10b) e se liga ao RNA de sentido positivo, formando o nucleocapsídeo no citoplasma celular (11). Ao passo que a poliproteína pE2-6K-E1 migra para o lúmen do retículo endoplasmático (10a). O processo de maturação se dá nesta organela (13). As proteínas estruturais seguem a via para maturação (14), uma vez maturados, os heterodímeros E1-E2 (15), são inseridos na membrana celular, formando um sítio para brotamento (16). O nucleocapsídeo recém formado se desloca para a região de brotamento (12) dando início a formação e liberação de novos vírions por brotamento (17). Adaptado de CONSTANT et al., 2021.

1.2- Patogênese da infecção por CHIKV

Após a infecção em células alvo como fibroblastos, osteoblastos, macrófagos e monócitos (revisto por GASQUE *et al.*, 2016), dá se início ao processo inflamatório que apresenta duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, a infecção por CHIKV, a febre CHIKV, apresenta sintomas inespecíficos como: febre, erupção cutânea e artralgia (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). Nesta fase é observada uma intensa resposta inflamatória, com altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias no soro, como interferon α (IFN α), IFN γ , fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL6), bem como de quimiocinas, como ligante de quimiocina (motivo C-C) (CCL2, CCL3 e CCL4; e baixas concentrações de IL10 (PETITDEMANGE; WAUQUIER;

VIEILLARD, 2015). A produção desses mediadores se dá pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), como o RNA genômico viral por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo *Toll* 3 (TLR3) e TLR7, bem como pelo gene I induzível por ácido retinoico (RIG-I) e proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5) (revisto por JENSEN; THOMSEN, 2012). O reconhecimento dos MAMPs induz uma cascata de produção de mediadores inflamatórios e fatores reguladores de interferon (IRFs) (revisto por NELEMANS; KIKKERT, 2019). Em fibroblastos, a infecção viral induz a produção de altas concentrações de IFN α e IFN β , que desempenham papel importante no controle da replicação viral (SCHILTE *et al.*, 2010). Contribuindo com o *clearance* viral, é observada a participação de células *natural killers* (NK), linfócitos T CD4, CD8 (HOARAU *et al.*, 2010) e células dendríticas plasmocitoides (pCDs) (WEBSTER *et al.*, 2018). As pCDs podem ser estimuladas a produzirem altas concentrações de IFN do tipo 1, durante a infecção viral, por ação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), produzidas por neutrófilos estimulados pela alta produção de IL-8 por células epiteliais infectadas, bem como pelo estímulo do reconhecimento de MAMPs por PRRs (revisto por SCHÖNRICH; RAFTERY, 2016). Além disso, é observada produção de altas concentrações de quimiocinas, como a CCL2, induzindo influxo de macrófagos para o sítio de infecção (LABADIE *et al.*, 2010). Os macrófagos, por sua vez, também apresentam função de reservatório para o CHIKV, contribuindo para a persistência viral no sítio de infecção (YAO *et al.*, 2023). Na fase crônica da resposta inflamatória são observados sinais clínicos como: fadiga, inchaço nas articulações/tenossinovite e artralgia persistente, com altos níveis de IL6, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), TNF, IL8 e baixos níveis IL4 e IL13 no soro de pacientes infectados por CHIKV (ROQUES; GRAS, 2011; DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012). Esses mediadores podem estar associados a quadros de severidade da infecção pelo CHIKV bem como a quadros de artralgia persistente, em que a baixa produção de alguns mediadores como TNF e IL13 na fase aguda da inflamação sejam possíveis indicadores de desenvolvimento de artralgia pelo paciente infectado (CHIRATHAWORN; CHANSAENROJ; POOVORAWAN, 2020). A artralgia crônica associada à infecção por CHIKV é de caráter simétrico, envolvendo grandes e pequenas articulações, como mãos, joelho, ombro, punho e tornozelos (SUHRBIER; JAFFAR- BANDJEE; GASQUE, 2012). Há relatos que a intensidade da dor sentida pelos indivíduos com articulações afetadas é comparável com a dor vivenciada por pacientes com artrite reumatoide (AR) (MINER *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que 20 - 40% dos pacientes não apresentam remissão sintomatológica (MARKS; MARKS, 2016). Este quadro está associado à capacidade do CHIKV de infectar diversos tipos celulares, como células endoteliais e células musculares, o que promove uma resposta inflamatória intensa (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017). Os monócitos e macrófagos desempenham importante papel na artralgia crônica associada ao CHIKV (DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012). Já os linfócitos T CD4⁺ desempenham papel importante por induzirem uma resposta do tipo Th1 (TEO *et al.*, 2017), enquanto linfócitos Treg atuam no controle da expansão de células T específicas para CHIKV (LEE *et al.*, 2015). Células NK exercem também papel importante na artrite associada à infecção por CHIKV, uma vez que essas células apresentam aumento degranulação e maiores níveis intracelulares de IFN γ , demonstrando sua capacidade citolítica (PETITDEMANGE *et al.*, 2016). Células B e anticorpos neutralizantes da subclasse IgG3 estão relacionados à eliminação do agente infeccioso (LUM *et al.*, 2013; KAM *et al.*, 2012). Monócitos e macrófagos exercem papel dual no processo inflamatório, contribuindo tanto para a inflamação como para a resolução (revisto por ZAID *et al.*, 2018). Em camundongos *knockout* para CCR2 foi observado que o infiltrado de monócitos e macrófagos foi substituído por um infiltrado de neutrófilos, que desempenham papel importante na exacerbação da inflamação induzida por CHIKV (POO *et al.*, 2014). Sinoviócitos, fibroblastos e osteoblastos, na presença deste arbovírus, produzem CCL2 e ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL), mediadores importantes para o recrutamento de monócitos/macrófagos e sua diferenciação em osteoclastos, o que, diante da infecção por CHIKV, produzem altas concentrações de IL6 e TNF. Assim, surge um ambiente favorável para o dano ósseo comprometendo a estrutura articular (TANABE *et al.*, 2018).

Além do acometimento de articulações, a infecção por CHIKV resulta em forte acometimento sistêmico (SCHILTE *et al.*, 2013), tendo sido demonstrado que há acometimento de diversos sistemas e sítios (RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010), como a cavidade bucal (BANDYOPADHYAY; GHOSH, 2010). Neste sítio de infecção, trabalhos apontam que os alfavírus, como o CHIKV são capazes de induzir alterações periodontais (ANESTINO *et al.*, 2024).

1.6- Relação entre CHIKV e alterações periodontais

Estudos costumavam associar o acometimento da cavidade bucal, na infecção por CHIKV, à presença de artralgia nas mãos de indivíduos infectados, o que impediria a realização de uma higienização correta (LEAO *et al.*, 2018). Esta associação também havia

sido feita na relação da doença periodontal (DP) com AR (PISCHON *et al.*, 2008). Entretanto, sabe-se hoje que a associação entre AR e DP não é indireta, devido à higienização precária e sim uma associação direta, conforme descrito anteriormente (revisto por SOUZA; BANSAL; GALLOWAY, 2017). Em pacientes com CHIKV, um estudo realizado na Índia, no *Indira Gandhi Government Medical College*, Nagpur, no estado de Maharashtra, demonstrou que, dos casos confirmados, 10,34% apresentavam quadro de gengivite (SURYAWANSHI *et al.*, 2009). Outros estudos, realizados na Índia, demonstraram que 13,64% dos infectados por CHIKV apresentaram múltiplas aftas, erosões e queilites (RIYAZ *et al.*, 2010); 54,32% dos pacientes apresentavam dor gengival, 54,32% apresentavam sangramento gengival e 0,97% possuíam elemento dentário instável (MOBEEN, 2015). As análises de parâmetros periodontais demonstraram que cerca de 5,15% dos indivíduos possuíam quadro de gengivite leve, 52,58% de gengivite moderada e 42,27% de gengivite grave. Entre 19,58% dos pacientes que apresentaram gengivite grave, observou-se acúmulo moderado a grave de biofilme bucal (KATTI; SHAHAPUR; UDAPUDI, 2011).

Sabe-se que CHIKV é capaz de interferir na diferenciação de osteoblastos (ROY *et al.*, 2019) e induzir reabsorção em ossos longos, como fêmur e tíbia (CHEN *et al.*, 2015). Entretanto, a relação entre a infecção por CHIKV e a DP ainda não é bem esclarecida.

1.3- Doença periodontal

A DP é uma condição inflamatória, de etiologia infecciosa, associada ao biofilme disbiótico, presente no sítio subgengival (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012; PAPAPANOU *et al.*, 2018). Acomete, com diferentes graus de gravidade, a gengiva, o osso alveolar e o ligamento periodontal, podendo culminar na perda do elemento dentário (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). A gengivite é uma das formas clínicas mais comuns da DP, podendo estar associada a quadros iniciais de periodontite (SHAH, 2017). A periodontite é uma forma clínica mais grave de DP, com destruição dos tecidos de suporte do elemento dentário, sendo observada perda óssea alveolar, perda de inserção clínica e formação de bolsa periodontal, além do sangramento gengival (PAPAPANOU *et al.*, 2018)

Cerca de 20 - 50% da população mundial apresenta DP, sendo que a população jovem é a mais acometida, com prevalência de 35% a 70% (NAZIR, 2017). Em 2010, um levantamento realizado na América Latina mostrou uma prevalência de 20,4% de DP (FREKEN *et al.*, 2017). Um estudo realizado no Brasil, também em 2010, mostrou que a região Sudeste apresentava os melhores parâmetros de saúde bucal, enquanto a região Norte

apresentou os piores parâmetros, com 58,4% das crianças com quadro de DP. Apenas 30,8% de indivíduos na faixa etária entre 15-19 anos possuíam periodonto saudável e, dentre os idosos, apenas 1% (PALMA; LEITE, 2014).

Dentre os micro-organismos que estão frequentemente associados ao biofilme disbiótico e isolados de processos inflamatórios na DP, estão bactérias Gram-negativas, anaeróbias obrigatórias ou microaerófilas, como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (TSUCHIDA *et al.*, 2017; IWAI, 2009; TEZAL *et al.*, 2006).

1.4- Patogênese da doença periodontal

O processo inflamatório da DP está associado ao reconhecimento de MAMPs por meio de receptores, como os TLRs (SILVA *et al.*, 2015; ARANCIBIA *et al.*, 2007; AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001). TLR2, TLR4 e TLR9 são altamente expressos em células do tecido periodontal, em pacientes com quadro de DP (ROJO-BOTELHO; GARCIA-HERNANDEZ; MORENO-FIERROS, 2011), desempenhando um papel importante no reconhecimento de componentes bacterianos, como Lipopolissacarídeo (LPS) (TLR4), lipoproteínas (TLR2) e DNA (TLR9) (FITZGERALD; KAGAN, 2020). Estes receptores estão presentes em diferentes tipos celulares, como macrófago, células T, células endoteliais, células epiteliais e neutrófilos (CEKICI *et al.*, 2014). Os neutrófilos estão presentes no periodonto tanto em condições fisiológicas quanto inflamatórias. Durante o processo inflamatório, o influxo de neutrófilos aumenta devido, principalmente, à maior produção de IL8 (BARROS *et al.*, 2016). Neutrófilos possuem diferentes mecanismos antimicrobianos como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), liberação de NETs e fagocitose, empregados para controlar ou eliminar micro-organismos (HIRSCHFELD, 2020). Entretanto, a alta produção de EROS (HERRMANN; MEYLE, 2015) e NETs - fibras de cromatina com enzimas associadas, como elastase e mieloperoxidase (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014), conferem aos neutrófilos um papel de agente indutor da degradação tecidual na DP (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2016).

O estímulo gerado a partir do dano tecidual periodontal permite ativação de outros tipos celulares residentes, como fagócitos mononucleares (MNP), células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T. Os MNPs e as APCs são produtores de citocinas como IL1 β , IL6, TNF, dentre outras, que atuam na diferenciação de linfócitos T (PAN; WANG; CHEN, 2019). Os linfócitos desempenham um papel importante na DP por estarem relacionados à

ativação de osteoclastos, células envolvidas na reabsorção do osso alveolar (GIBERTONI *et al.*, 2017). Os subtipos de linfócitos T mais prevalentes nos tecidos periodontais são: i) Th1, produtores de IL2, IFN γ e TNF; ii) Th2 que produzem IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13, iii) os linfócitos Treg que são produtores de IL10 e TGF β (TENG, 2003); e iv) Th17, produtores de IL17 (NAUFEL *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2014).

Durante o processo inflamatório, além da produção de mediadores pró- inflamatórios, como TNF, IL1 β , IL6, IFN γ , IL12, IL8 e CCL2 que possuem um papel importante no metabolismo ósseo, por atuarem na indução da perda óssea alveolar, há também a produção de citocinas anti-inflamatórias e imunorreguladoras, como TGF β , IL10 e IL4, (HAUNG; GIBSON, 2014). Além disso, durante o processo inflamatório, citocinas como TNF e IL1 β induzem alta produção de PGE2 via ciclooxigenase 2 em macrófagos e fibroblastos (NOGUCHI; ISHIKAWA, 2007). Citocinas pró-inflamatórias e PGE2 estão associadas à diferenciação e ativação de osteoclastos, devido à indução da expressão de RANKL, encontrado na forma solúvel ou associado à membrana de células, como osteoblastos, fibroblastos e linfócitos T, como os linfócitos Th17 (DANKS *et al.*, 2016) e B (KOBAYASHI *et al.*, 2005; DEL FATTORE; TETI; RUCCI, 2008; KAJI *et al.*, 2009, COCHRAN, 2008;). RANKL liga-se ao receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK), presente na superfície de células precursoras de osteoclastos e, assim, induz a osteoclastogênese (YUAN *et al.*, 2011). Células precursoras de osteoclastos são células de origem hematopoiética que, quando diferenciadas, são importantes na reabsorção óssea. Já os osteoblastos são células de origem mesenquimal, responsáveis pela deposição da matriz óssea (BOYCE; XING, 2008).

Além dessas proteínas, no sítio periodontal, é observada a presença de um receptor alternativo de RANKL, e osteoprotegerina (OPG). OPG é produzida por osteoblastos e atua como uma proteína moduladora da atividade de osteoclastos, pois, ao ligar-se a RANKL, impede a ativação da via osteoclastogênica (KHOSLA, 2001). Fibroblastos e linfócitos T e B produzem altas concentrações de RANKL (KAWAI *et al.*, 2006). Os níveis de RANKL, RANK e OPG são importantes para a manutenção da homeostase óssea. Contudo, durante o processo inflamatório, há produção de citocinas osteoclastogênicas como IL1 β , IL17 e TNF. Estas citocinas induzem o aumento da expressão de RANKL, interferindo no balanço RANKL/RANK/OPG, favorecendo a osteoclastogênese, o que determina a lesão óssea alveolar irreversível que ocorre na DP (BEZERRA *et al.*, 2005).

Além das vias canônicas de osteoclastogênese mediadas por RANKL, existem as vias não canônicas mediadas por membros da superfamília do TNF, como TNF, um ligante indutor de proliferação (APRIL), fator de ativação de células B (BAFF), linfotóxina exibindo expressão induzível e competindo com a glicoproteína D do vírus herpes simplex pelo mediador de entrada do herpesvírus, um receptor expresso pelos linfócitos T (LIGHT). Além disso, outros mediadores também já foram descritos como, TGF β , IL6, IL11, IL8, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento placentário (PlGF) e ligante de tirosino-quinase 3 Fms-relacionado (Flt3) (revisto por KNOWLES; ATHANASOU, 2009).

TNF é descrito como um importante mediador associado a processos de catabolismo ósseo (revisto por BIRKEDAL-HANSEN, 1993), capaz de induzir a osteoclastogênese independentemente da presença de RANKL, ao interagir diretamente com RANK. Entretanto, tem sido descrito um sinergismo entre esses mediadores, como a capacidade de TNF de potencializar a ação de RANKL na osteoclastogênese (LAM *et al.*, 2000). LIGHT é expresso por células T *naive* e células dendríticas imaturas. Ao ser expresso por essas células, LIGHT induz uma resposta mediada pela interação células dendríticas e células T, levando à ativação dessas células T *naive* a células produtoras de IFN γ (TAMADA *et al.*, 2000). LIGHT também é expresso em monócitos, neutrófilos e células mieloides (BRUNETTI *et al.*, 2014), capaz de induzir a formação de osteoclastos, interferir na formação de osteoblastos e nas suas atividades de deposição de matriz óssea, independente da presença de RANKL. Porém, já foi observada uma ação sinérgica entre LIGHT e RANKL na diferenciação de células precursoras a osteoclastos (BRUNETTI *et al.*, 2014).

APRIL e BAFF estão associados à reabsorção óssea patológica presente no mieloma múltiplo, uma vez que são fatores de crescimento e sobrevivência para as células, interagindo com seus respectivos receptores: antígeno de maturação de células B (BCMA), ativador transmembrana e modulador de cálcio e interagente ligante de ciclofilina (TACI), proteoglicanos de sulfato de heparano e receptor BAFF (BAFF-R) presentes em células de mieloma múltiplo alocadas no microambiente da medula óssea (ABE *et al.*, 2006). Esses mediadores possuem a capacidade de induzir a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea de maneira independente de RANKL (HEMINGWAY *et al.*, 2011) uma vez que células como monócitos e neutrófilos presentes na medula são produtoras desses mediadores, assim como os osteoclastos (MOREAUX *et al.*, 2005).

Já os mediadores inflamatórios que não são pertencentes à superfamília do TNF, como IL6, amplamente produzido por monócitos, osteoblastos e osteoclastos, atuam na formação de osteoclastos de maneira independente de RANKL. Porém é dependente da expressão de receptores de IL6 por células precursoras de osteoclastos, induzindo a diferenciação em osteoclastos (UDAGAWA *et al.*, 1999; FENG *et al.*, 2017). Assim como IL6, IL11, citocina expressa principalmente em células de origem mesenquimal, como os osteoblastos (WILSON *et al.*, 2003), é capaz de induzir a formação de osteoclastos de forma independente de RANKL, a partir da sua interação com a subunidade gp130 (KUDO *et al.*, 2013). Além disso, em pacientes diagnosticados com leucemia linfocítica crônica, IL11, juntamente com TNF e IL6, interferem na osteoclastogênese e, consequentemente, na deposição de matriz óssea, favorecendo um ambiente de reabsorção (GIANNONI *et al.*, 2021). Juntamente com IL6 e TNF, IL8, citocina quimioatraente para neutrófilos e produzida por células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, é um potente estimulador de diferenciação de células precursoras de osteoclastos, de maneira direta ou induzindo o aumento da expressão e produção de RANKL (BENDRE *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2019; AMARASEKARA *et al.*, 2018; KOPESKY *et al.*, 2014). Já os fatores de crescimento HGF, VEGF, PlGF e Flt3 são capazes de induzir a osteoclastogênese a partir da sua interação direta com RANKL, atuando como moléculas substitutas de M-CSF (TAYLOR *et al.*, 2012).

1.5- Relação entre artrite e DP

Artrite e DP são doenças inflamatórias crônicas (PERSSON, 2012) e alguns mecanismos estão envolvidos na associação entre a DP e a AR. Dentre os mecanismos inclui-se a produção de citocinas pró- inflamatórias, tais como IL1, IL6 e TNF, a deposição de imunocomplexos, periodontite crônica associada a alelos *HLA-DRB1*, predominância de células B nos tecidos periodontais, presença de fator reumatoide (RF) e a presença de *P. gingivalis* no biofilme subgengival, que secreta enzimas responsáveis pela citrulinização de proteínas - principal alvo de anticorpos autoimunes (revisto por GÓMEZ-BAÑUELOS *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2017).

Além de *P. gingivalis*, já foi demonstrado que *A. actinomycetemcomitans* também possui um papel na associação entre DP e AR (KONIG *et al.*, 2016). Utilizando um modelo de artrite inflamatória em camundongos, um trabalho mostrou uma exacerbação nas alterações periodontais induzidas por *A. actinomycetemcomitans*, como o aumento dos níveis de IFN γ no periodonto, aumento no número de osteoclastos associados à crista óssea alveolar e de

linfócitos Th1 nos linfonodos cervicais (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2012). Em pacientes com quadro de artrite, um estudo identificou altas concentrações de anticorpos anti-Leucotoxina A (anti-LtxA) de *A. actinomycetemcomitans* (VOLKOV *et al.*, 2018). A LtxA é uma exotoxina codificada pelo operon ltxCABD e exerce papel importante na proteção contra a ação de leucócitos, auxiliando na sobrevivência de *A. actinomycetemcomitans* durante o processo de infecção (OSCARSSON *et al.*, 2019). LtxA induz a formação de poros nas membranas de neutrófilos, alterando a integridade da membrana e levando ao aumento rápido de cálcio no meio intracelular, o que leva à hipercitrulinação de proteínas. Estas proteínas são posteriormente liberadas para o meio extracelular, desempenhando um papel de ativação da resposta autoimune associada à artrite (KONIG *et al.*, 2017).

GOLUB *et al.* (2006) apresentaram a hipótese de “two hits”, ou “dois estímulos”, para explicar a associação entre a DP e a AR. Segundo a hipótese apresentada, o primeiro estímulo ocorreria pela presença de microrganismos na cavidade bucal, que por sua vez estimulariam uma resposta inflamatória. O segundo estímulo, que seria o aumento sérico de mediadores inflamatórios observados na RA, como IL6, TNF e IL1 β , em associação com o primeiro estímulo, estimulariam uma intensa resposta inflamatória no periodonto, resultando no aumento da osteoclastogênese no sítio e reabsorção óssea (revisto por LEECH; BARTOLD, 2015; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2011).

2- Justificativa

Tem sido demonstrado que a infecção pelo CHIKV possui caráter sistêmico, sendo observado acometimento de diversos sítios. Dentre esses sítios, está a cavidade bucal. É observado em pacientes infectados por CHIKV quadros de gengivite grave e instabilidade do elemento dentário, acúmulo de biofilme bucal na infecção por CHIKV, sugerindo que ocorrem alterações na microbiota bucal. Sabe-se que alterações na microbiota bucal estão associadas a um intenso processo inflamatório periodontal. Esses quadros sugerem uma possível inflamação nos tecidos periodontais associada à indução da ativação de células osteoclastogênicas como osteoblastos e osteoclastos, que culmina em um desbalanço metabólico promovendo a reabsorção óssea e levando à instabilidade observada. CHIKV é um indutor de osteoclastogênese nas articulações. Entretanto, pouco se sabe de seu impacto em outros sítios, como é o caso da cavidade bucal, apesar de serem relatados sinais clínicos associados a DP em pacientes infectados por este vírus. Além disso, uma parcela importante da população apresenta

DP em alguma fase da vida. É hipótese desse trabalho que a infecção por CHIKV induza intenso processo inflamatório sistêmico que culmina em alterações periodontais. Dessa forma, o estudo dos mecanismos envolvidos pode abrir novas perspectivas para o entendimento da associação entre a infecção por CHIKV e as alterações periodontais.

3- Objetivo geral

Avaliar os impactos da infecção sistêmica pelo *Chikungunya virus* nos tecidos periodontais de camundongos

3.1- Objetivos específicos

3.1.1- Caracterizar as alterações periodontais induzidas pela infecção por CHIKV;

3.1.2- Avaliar a ação de CHIKV na osteoclastogênese;

3.1.3- Avaliar a participação de IL6 na perda óssea alveolar induzida por CHIKV;

3.1.4- Avaliar o papel da microbiota bucal na perda óssea alveolar induzida por CHIKV.

4. Material e Métodos

4.1- Camundongos

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados grupos de camundongos C57BL/6j e CD1, machos, com idade entre 3-4 semanas, em grupos com n = 3, 5 ou 7, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos *Il-6^{-/-}* foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia e os camundongos *germ free* (GF) foram fornecidos pelo Biotério de Gnotobiologia da UFMG. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração, ciclo claro-escuro de 12 horas, controle de temperatura e ventilação. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, conforme protocolo nº 261/2020, anteriormente à realização dos mesmos.

4.2- Propagação e concentração de *Chikungunya virus*

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem Asiática de CHIKV isolada de amostra clínica de um paciente virêmico, que foi gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Lacerda Nogueira, da

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, sob número de acesso BHI3762/H 804917 e registro no SisGen sob o número AFD 6099. CHIKV foi propagado em células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a 37°C, em meio de cultivo Leibowitz L15, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antimicrobianos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 2% Soro Fetal Bovino (SFB) – por 5 - 7 dias. Os sobrenadantes das culturas foram centrifugados a 600 g por 10 min para retirada dos fragmentos celulares. Subsequentemente, o sobrenadante foi adicionado à coluna de concentração viral (Vivacell 100 *centrifugal concentrator* – Sartorius, Alemanha) e as partículas virais foram concentradas por centrifugação (2000 g por 10 min). O volume obtido foi aliquotado e armazenado em *freezer* -80°C. Para preparar o inóculo experimental, a alíquota do vírus foi cuidadosamente homogeneizada usando um vórtice e diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para atingir a concentração de carga viral desejada.

4.3- Desenho experimental

Para caracterizar as alterações periodontais induzidas pela infecção viral, camundongos C57BL/6 foram submetidos a uma cinética de infecção em que receberam via intraplantar 10^6 UFP/mL e CHIKV. Os animais pertencentes ao grupo controle receberam via intraplantar inóculo isento de vírus, porém contendo o meio de cultivo celular em que houve a recuperação viral diluído nas mesmas proporções. Nos tempos experimentais de 1, 3, 7, 14, 21 ou 28 dias, foram avaliadas quantificação viral (UFP) no soro, masseter e tecidos periodontais, a perda óssea alveolar (pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na face palatina do primeiro molar superior esquerdo), aumento do número de células TRAP+ (TRAP), e mediadores inflamatórios (ELISA).

A avaliação da participação de IL6 no fenótipo de perda óssea alveolar observado no modelo experimental foi realizada pela estratégia experimental que consistia em submeter animais C57BL/6 (WT) e deficientes para o receptor de IL6 (*il6r^{-/-}*) a infecção via intraplantar com um inóculo contendo 10^6 UFP/mL de CHIKV. 7 dias após a infecção foi avaliada a perda óssea alveolar.

O papel da microbiota foi avaliado seguindo a estratégia experimental que camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de infecção viral e com auxílio de um *swab*, o biofilme bucal foi coletado e submetido a análise de microbioma nos tempos 0, 3 e 7 dias pós-infecção. Além disso, animais CD1 e *germ free* foram infectados via intraplantar com CHIKV e foi

avaliada a perda óssea alveolar 7 d.p.i. Outros camundongos C57BL/6 foram submetidos a aplicação tópica de clorexidina (CHX) 0,12% na cavidade bucal. Foram avaliadas a perda óssea alveolar, aumento do número de células TRAP+ (TRAP). Os protocolos experimentais estão representados na figura 4.

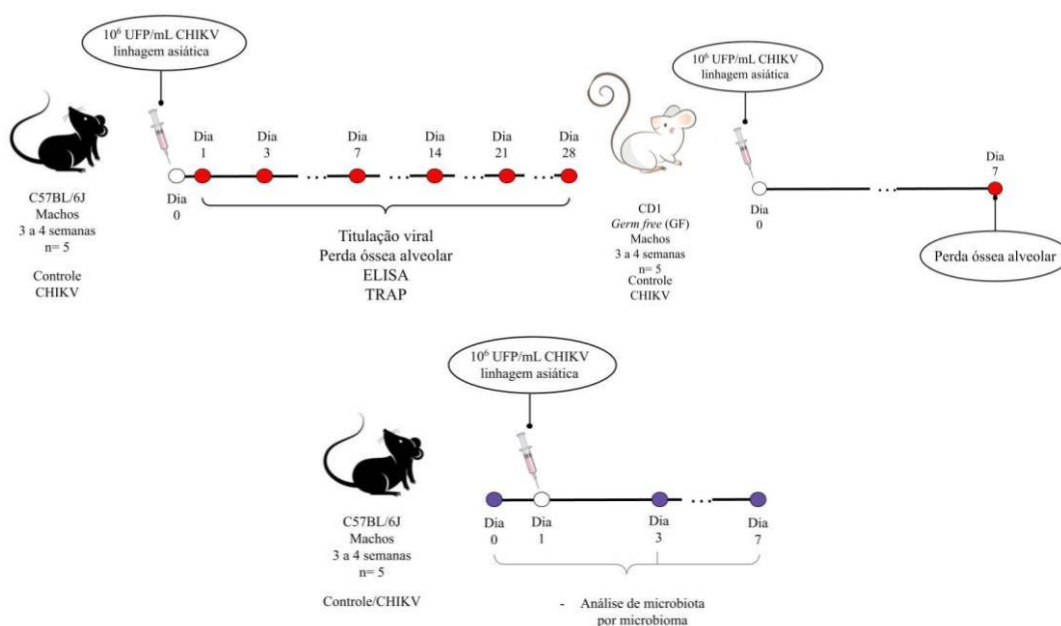


Figura 4. Protocolos experimentais. Estratégias experimentais adotadas para indução de perda óssea alveolar pela infecção por CHIKV e avaliação de possíveis mecanismos associados às alterações periodontais observadas no modelo experimental.

4.4- Avaliação da produção de mediadores inflamatórios por ELISA

Inicialmente, as amostras de maxilas foram pesadas e processadas em solução para extração de citocinas (solução de PBS com 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 0,01 mg/mL aprotinina A, pH 7.4 e Tween 20 a 0,05% e pastilhas inibidoras de proteases (SIGMA-ALDRICH, SP, Brazil) na proporção de 1 mL para 100 mg de tecido. O tecido foi processado utilizando-se um homogeneizador de tecidos (PowerGen 100, Fisher Scientific) e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes das amostras e da cultura de fibroblastos foram coletados e mantidos a - 20°C para o ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA foi realizado para quantificar a concentração de TNF, IFN γ , IL6, IL10, RANKL, OPG e CCL2 nos tecidos periodontais, RANKL e OPG no soro, concentrações de TNF, IL6, IL10, RANKL e CCL2 foram quantificadas no sobrenadante de fibroblastos 24, 48 e 72 horas após infecção com CHIKV utilizando kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O anticorpo de captura

para o antígeno de interesse foi adicionado a uma placa de 96 poços e incubado por 24 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas por 1 h com PBS contendo BSA 1%, em temperatura ambiente. As amostras e o padrão de interesse foram diluídos em solução de BSA 0,1% e ambos incubados *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e foram incubadas na presença dos anticorpos de detecção. Após 2 h, as placas foram lavadas e adicionadas às placas uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Depois de 20 min, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado tampão contendo ortofenilenodiamina (OPD). A reação foi interrompida adicionando uma solução de H₂SO₄ 1M. A densidade óptica foi obtida com o uso de espectrofotômetro (MQX200, BioTeK, USA) no comprimento de onda de 490 nm. O resultado foi expresso em pg/100 mg de tecido.

4.5- Determinação de carga viral

Para determinar a carga viral nas amostras de hemi-maxila, masseter, glândula salivar, coxim plantar direito e soro dos camundongos infectados por CHIKV, foi empregada a técnica de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise, como descrito (BAER; KEHN-HALL, 2014). Brevemente, células da linhagem VERO (células derivadas de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) provenientes do BCRJ, foram crescidas em meio RPMI 1X, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antimicrobianos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% SFB. As células foram tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placas de 12 poços, a uma densidade de 10⁶ células/poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até apresentarem uma monocamada de confluência entre 85 a 90%. Os estoques virais foram diluídos serialmente em meio RPMI. As amostras de hemi-maxila, masseter e coxim plantar foram pesadas, maceradas em gral e pistilo esterilizados e diluídas serialmente na proporção de 10% peso/volume, em meio RPMI com antimicrobianos, na ausência de SFB. As amostras de soro foram diluídas serialmente volume/volume em meio RPMI com antimicrobianos, na ausência de SFB. Foram adicionados 300 µL, por poço, de cada uma das diluições (10⁻³ a 10⁻⁶) das amostras. O controle de células foi um poço não inoculado, contendo apenas o meio RPMI com antimicrobianos, na ausência de SFB, nos mesmos volumes. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C (período de adsorção viral), sob leve agitação. Em seguida, o meio foi desprezado e as células lavadas com RPMI. Foi adicionado DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) contendo 1.6% de carboximetilcelulose, antimicrobianos e 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C

por quatro dias, para observação dos efeitos citopáticos ao microscópio invertido. Após este período, foram fixadas com formol tamponado a 10% por 30 minutos e, posteriormente, coradas com cristal violeta 1% p/v, para a determinação do título viral das amostras, expressos em unidades formadoras de placa (UFP)/mg ou UFP/mL.

4.6- Quantificação de perda óssea alveolar

Ao final de cada período experimental, foi realizada a eutanásia dos camundongos e as maxilas foram removidas. As maxilas foram submersas em solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes, diluído em igual volume de água destilada, durante 24 horas, para remoção dos tecidos moles. Posteriormente, as maxilas foram lavadas e deixadas secar em temperatura ambiente. Para a quantificação da perda óssea alveolar, as maxilas foram coradas com solução de azul de metileno 0,3%. Para obtenção das imagens, as maxilas foram fotografadas (Kodak EasyShare C743, Manaus, Brasil) utilizando-se o aumento da objetiva do microscópio estereoscópico binocular 200 M (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Q724S-1, Diadema, Brasil). As imagens foram obtidas da região palatina dos molares superiores. Com o auxílio do programa *Image J*, foram obtidas as medidas da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA). Para os experimentos de infecção viral, foi realizada a avaliação da perda óssea alveolar na região palatina do primeiro molar superior e, para o experimento de ligadura, foi realizada avaliação de perda óssea alveolar na região palatina do segundo molar superior das maxilas analisadas.

4.7- Coloração de TRAP

Após cada tempo experimental, as amostras de maxilas dos animais foram coletadas e submetidas à fixação com formalina neutra tamponada 10% por 48 horas e, posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente e submetidas à descalcificação com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 14%, por 30 dias. Após a descalcificação, o EDTA foi retirado com lavagens de 15 em 15 minutos em água corrente e, logo em seguida, as maxilas foram desidratadas por meio da utilização de concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol. Em seguida, as maxilas receberam banhos de parafina e, posteriormente, foi realizada a inclusão final em bloco de parafina para posterior obtenção de cortes com espessura de 5 µm. As lâminas com corte histológico foram utilizadas para a coloração pela técnica de Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato - TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), seguindo as recomendações do fabricante. Após a coloração, as lâminas passaram pelo processo de secagem

e foram, posteriormente, montadas com Entelan® (Pró-análise, Porto Alegre, Brasil). A quantificação de células TRAP-positivas foi realizada no osso alveolar, ao longo das raízes do primeiro molar superior é definida como número total de células positivas, em aumento de 1000 X.

4.8- Análise da microbiota bucal por sequenciamento

Amostras de biofilme bucal de animais C57BL6 machos de 4 semanas, do grupo controle ou infectados, foram obtidas com auxílio de *swab*, no período da manhã. Os *swabs*, posteriormente, foram embebidos em tubos contendo 500 µL de tampão Tris EDTA (1M Tris pH 8, 0.5M EDTA pH8 e dH₂O). Foram adicionados a essa solução 30 mg de *beads* de zircônio 0,1 mm (LOCCUS, SP, Brasil) e as amostras foram submetidas a processamento utilizando-se TissueLyser LT (QIAGEN, Hilden, Alemanha), sob programação de 50 oscilações por 10 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram submetidas ao protocolo de extração de DNA bacteriano utilizando-se o *QIAamp DNA stool Mini kit* (50) (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a região V3-V4 do gene 16S foi amplificada por PCR e submetida ao sequenciamento pelo sequenciador MiSeq Illumina, seguindo o protocolo do *Earth Microbiome Project*, com auxílio do CELAM (Centro de Laboratórios Multiusuários) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (VERSCHUREN *et al.*, 2018). As sequências da região do gene 16S foram obtidas em formato fastq e foram analisadas usando QIIME2 (versão 2021.2) (BOLYEN *et al.* 2019). As sequências foram demultiplexadas e selecionadas por qualidade, usando o método Dada2, com os parâmetros padrão do QIIME2, a fim de detectar e corrigir os dados obtidos pelo sequenciamento Illumina, sendo gerada tabela de artefato Qiime 2, tabela OTU ou arquivo BIOM. Após a remoção das quimeras, as OTUs foram mantidas quando representaram mais de 0,005% do número total de sequências (BOKULICH *et al.*, 2013). As OTUs então foram classificadas usando o banco de dados de referência 16S Silva138 (QUAST *et al.* 2013). Em seguida, os dados gerados foram carregados pela biblioteca Phyloseq (versão 1.34.0) do R, na qual foram feitas as análises estatísticas e de abundância taxonômica.

4.9- Avaliação de hipernociceção

A análise de hipernociceção foi realizada baseada em trabalhos publicados por nosso grupo de pesquisa (COSTA *et. al*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2023). Inicialmente, os animais C57BL/6j e *il6R^{-/-}* foram acomodados em gaiolas de acrílico com piso de grade durante 30 minutos antes

do início para que assim o animal fosse ambientado. Desse modo, o animal não seria afetado pelo estresse durante o ensaio experimental. Após o intervalo de ambientação, com auxílio de um pressômetro eletrônico (INSIGTH Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e uma ponteira romba de 0,5 mm² na parte posterior da pata induzindo uma flexão das articulações do animal até que fosse observado o fenômeno de retirada de pata. A força exercida sob as articulações dos animais foi registrada pelo sensor e foram obtidos os valores após 3 medidas realizadas de forma individual dos grupos experimentais. Os resultados foram expressos em média das médias obtidas.

4.10- Cultura de osteoclastos

Células da linhagem RAW 264.7 foram suspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram colocadas em garrafa de cultura com volume final de 10 mL de meio. Após a formação de uma monocamada de células, com confluência de 80 - 90%, as células foram lavadas com cloreto de sódio 0,9%, ressuspensas e contadas na câmara de Neubauer. Após, foram plaqueadas na quantidade de 10³ de células por poço, em placas de 96 e 10⁴ de células por poço, em placas de 24 poços (com lamínula estéril), contendo RANKL murino recombinante (50 ng/mL, R&D Systems, MN, EUA) e estimuladas com CHIKV (MOI = 0,1). As células foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por 3 dias. Ao final do período experimental, o sobrenadante foi removido e aliquoteado para quantificação do título viral (UFP/mL). As células presentes no poço foram submetidas a avaliação da viabilidade celular por MTT. As lamínulas foram fixadas em uma solução de citrato, acetona e formaldeído 37%, e coradas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, Sigma-Aldrich, por 1 hora a 37°C. Após esse período, foram coletadas e fixadas em lâminas de histologia com auxílio do Entelan® (Pró-análise, Porto Alegre, Brasil). O número de células TRAP-positivas foi obtido por avaliação das lamínulas em microscópio óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Os dados foram expressos em quantidade de células/campo, no aumento de 40X. Foram consideradas apenas as células coradas e com 3 ou mais núcleos.

4.11- Cultura de fibroblastos

As células foram obtidas a partir de amostras gengivais do palato de animais CD1 ou C57BL/6 machos, de até 8 semanas. Os tecidos foram submetidos à digestão por collagenase do tipo 4 e, posteriormente, lavados com DMEM composto com antibacterianos e antifúngicos e suplementado com 15% de SFB. O tecido digerido foi transferido para uma garrafa pequena de cultura celular. Após 7 dias, foram feitas passagens até as células apresentaram morfologia

característica de fibroblastos. Posteriormente, as células foram estimuladas com CHIKV inativo ou ativo (MOI = 1, 0,1 ou 0,01). O vírus inativo foi obtido após exposição de um inoculo de CHIKV a luz ultravioleta (UV) por 2 horas. As células foram mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, por 3 dias. Ao final do período experimental, o sobrenadante foi aliquoteado para quantificação do título viral (UFP/mL), quantificação de RANKL e IL6 por ELISA. Foi realizada também a avaliação de viabilidade celular por MTT.

4.12- Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de *Student* não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$.

5. Resultados

Tendo em vista que a perda óssea alveolar está associada a três processos: osteoclastogênese, inflamação periodontal e alterações na microbiota, os resultados do presente estudo serão apresentados em capítulos.

A infecção intraplantar por CHIKV induziu à disseminação do vírus no modelo experimental. Os resultados demonstram que 1 dia após a infecção (dpi) ocorre viremia, com acometimento de outros sítios, como glândula salivar, maxila e masseter dos camundongos (Fig. 5). No tempo de 3 dpi foi possível recuperar CHIKV na maxila e masseter (Fig. 5). No 7 d.p.i não foi detectada formação de placas de lise em nenhum tecido analisado.

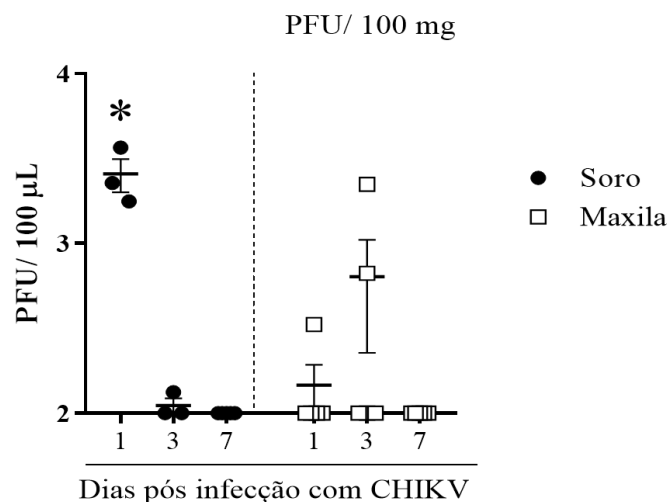


Figura 5. Cinética de recuperação viral no soro, tecidos periodontais de camundongos C57BL6 WT. (A) Recuperação viral no soro, tecidos periodontais e adjacentes por titulação. A análise estatística foi realizada entre dois tempos experimentais (1 e 3 dpi) e foi utilizado o teste t de *Student* não pareado.

Em seguida, foi avaliada se a presença de CHIKV nos tecidos periodontais estaria associada a alterações nesse sítio. Os resultados mostram que houve perda óssea alveolar a partir de 7 dpi (Fig.6A e B). Não foi observada progressão do fenótipo.

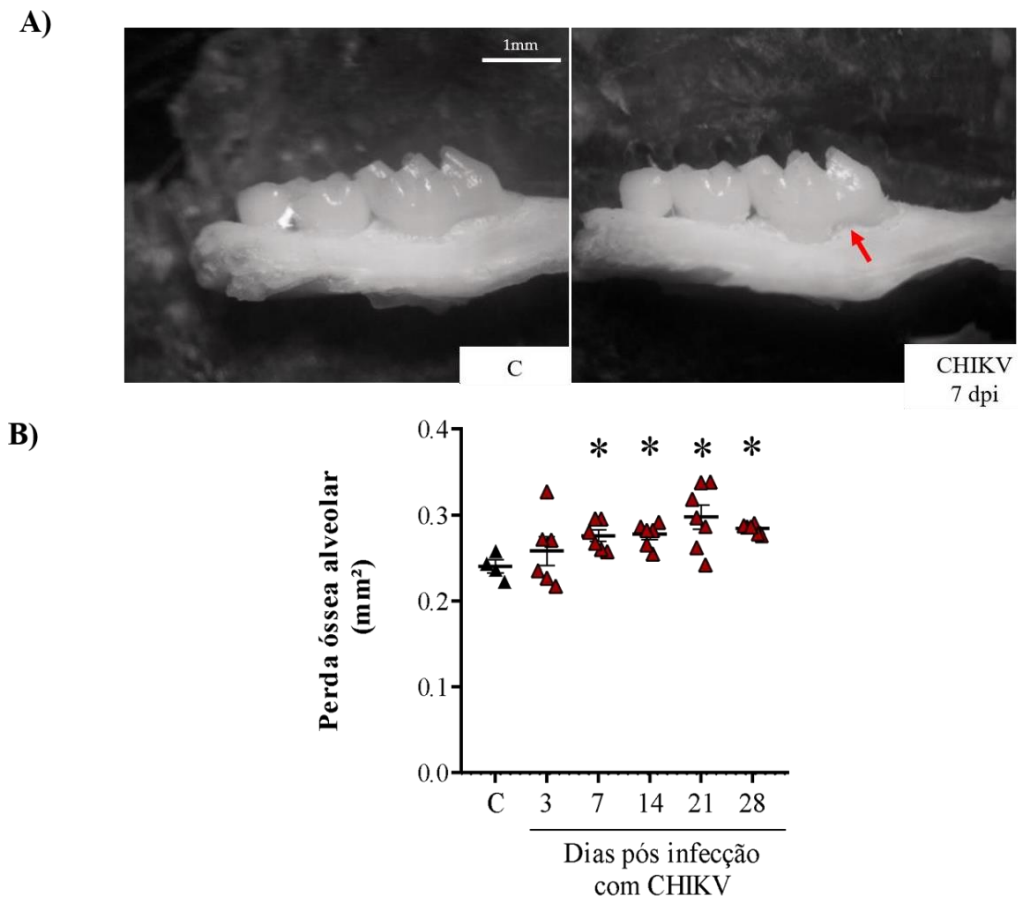


Figura 6. Cinética de perda óssea alveolar em camundongos WT. (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar 7 dpi. Indicada pela seta. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. Escala =1 mm. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle). A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

Sabe-se que a perda óssea alveolar está associada à osteoclastogênese e ao aumento da atividade de osteoclastos (revisto por OMI; MISHINA, 2022). Sendo assim, foi avaliado se a perda óssea alveolar observada no modelo experimental estaria associada à osteoclastogênese. Nossos resultados mostram que a partir de 7 dpi houve um aumento do número de células TRAP⁺ associadas à crista óssea alveolar dos animais (Fig. 7A e 7B). O aumento do número dessas células foi associado ao aumento da produção de RANKL, diminuição de OPG e desbalanço da razão RANKL:OPG nos tecidos periodontais desses animais (Fig. 8A, 8B e 8C), porém não foi observada alterações nos níveis séricos de RANKL e OPG nos camundongos (Fig. 8D, 8E e 8F).

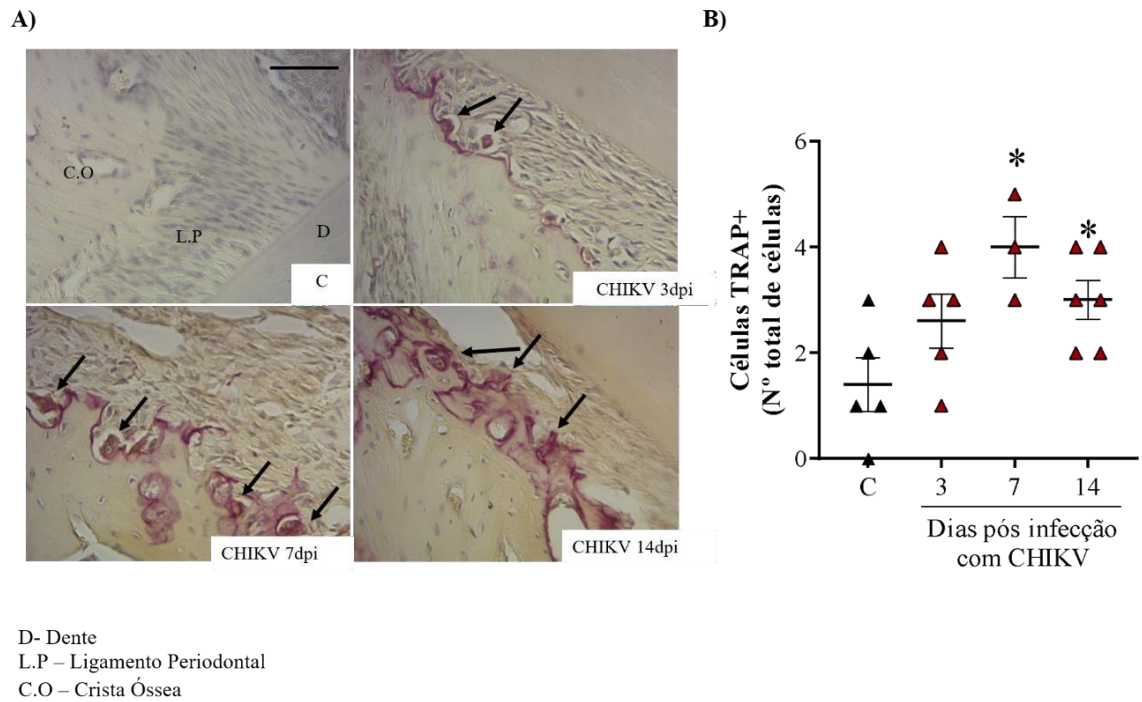


Figura 7. Quantificação de células TRAP em camundongos WT infectados com CHIKV. (A) Células TRAP positivas presentes no tecido periodontal. Indicadas pelas setas. Barra = 1 mm, aumento = 40X. (B) Quantificação de células TRAP positivas totais no tecido avaliado. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle). A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

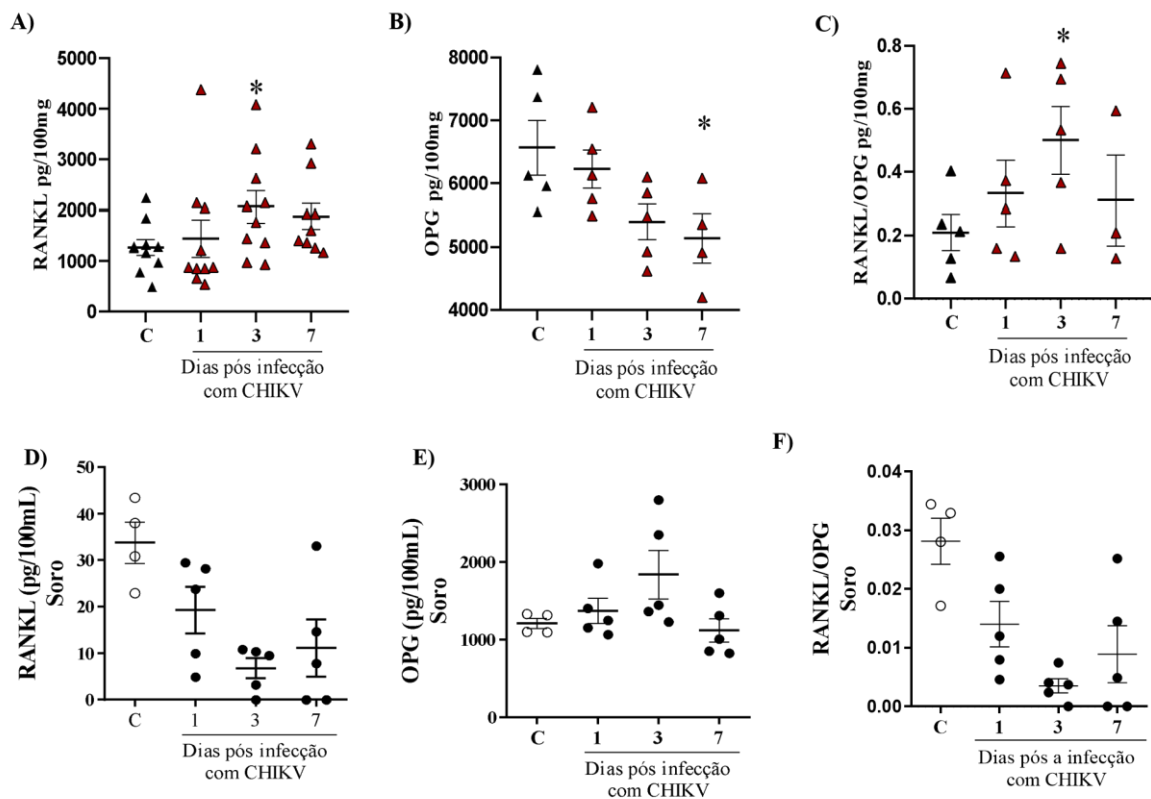
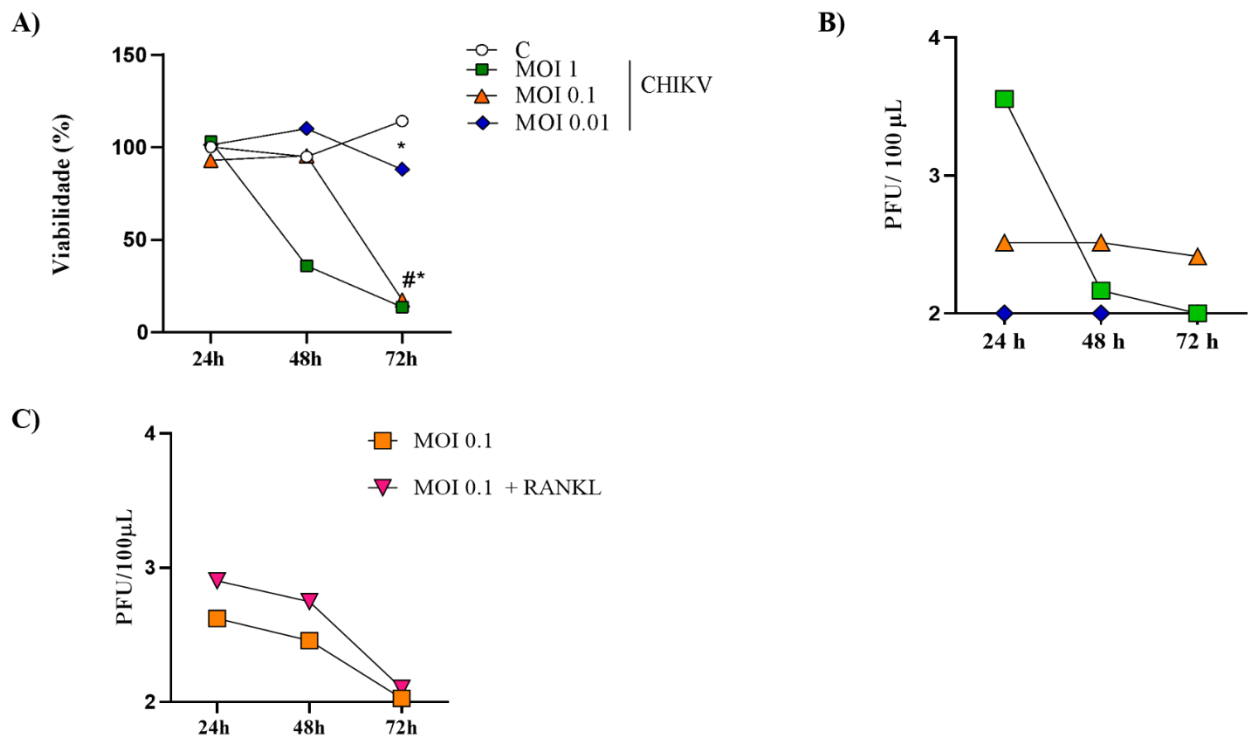


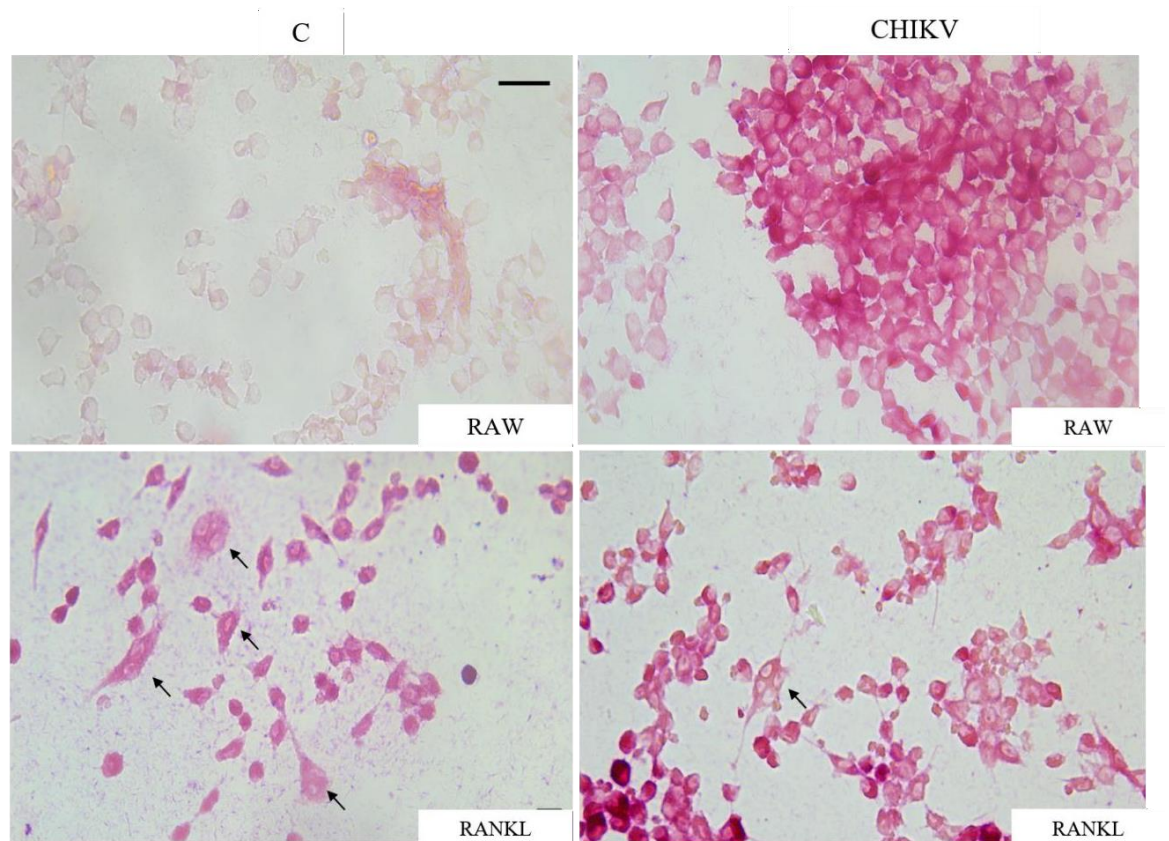
Figura 8. Cinética de produção de RANKL, OPG e razão RANKL:OPG nos tecidos periodontais e no soro de animais WT. (A,D) Produção de RANKL, (B,E) OPG e (C,F) RANKL:OPG nos tecidos periodontais e soro

obtido a partir do ELISA. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle). A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

Sabe-se que há um impacto da infecção por CHIKV na atividade e na diferenciação de osteoblastos (ROY *et al.*, 2020), células importantes para o metabolismo ósseo. Entretanto, pouco se sabe sobre o impacto de CHIKV em osteoclastos. Assim, foram avaliadas as possíveis alterações induzidas por CHIKV na viabilidade, multiplicação e diferenciação de osteoclastos. Para padronizar a infecção em osteoclastos, inicialmente, precursores dessas células, macrófagos imortalizados RAW 264.7, foram infectados ou não com CHIKV. Os resultados mostram que, nas MOI testadas, CHIKV levou a perda de viabilidade de células precursoras (Fig. 9A). CHIKV foi recuperado apenas nas MOI de 1 e 0,1 (Fig. 9B). Já em osteoclastos, após a infecção com CHIKV na MOI 0,1, não foi observada diferença de título viral quando comparadas as células RAW 264.7 (Fig. 9C). A infecção viral não induziu a osteoclastogênese (Fig. 9D e 9E). Células RAW 264.7 infectadas não se diferenciaram a osteoclastos na presença de RANKL (Fig. 10A e 10B).



D)



E)

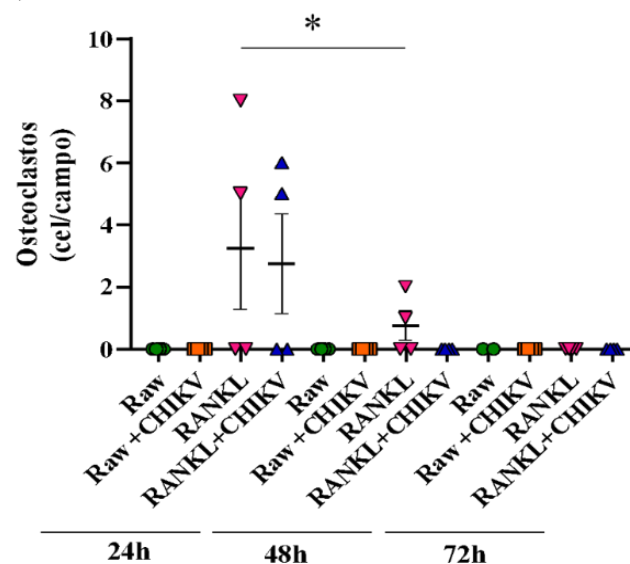


Figura 9. Avaliação da infecção em células RAW 264.7 e osteoclastos. (A) Avaliação da viabilidade celular em diferentes MOI, 24, 48 ou 72 horas pós infecção. (B, C) Recuperação de vírus do sobrenadante por titulação. (D) Imagens representativas da análise de TRAP. Osteoclastos indicados pelas setas. Barra = 10 μ m, aumento = 40X. (E) Análise de TRAP, pós-infecção por CHIKV na MOI 0,1. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); # $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos infectados. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

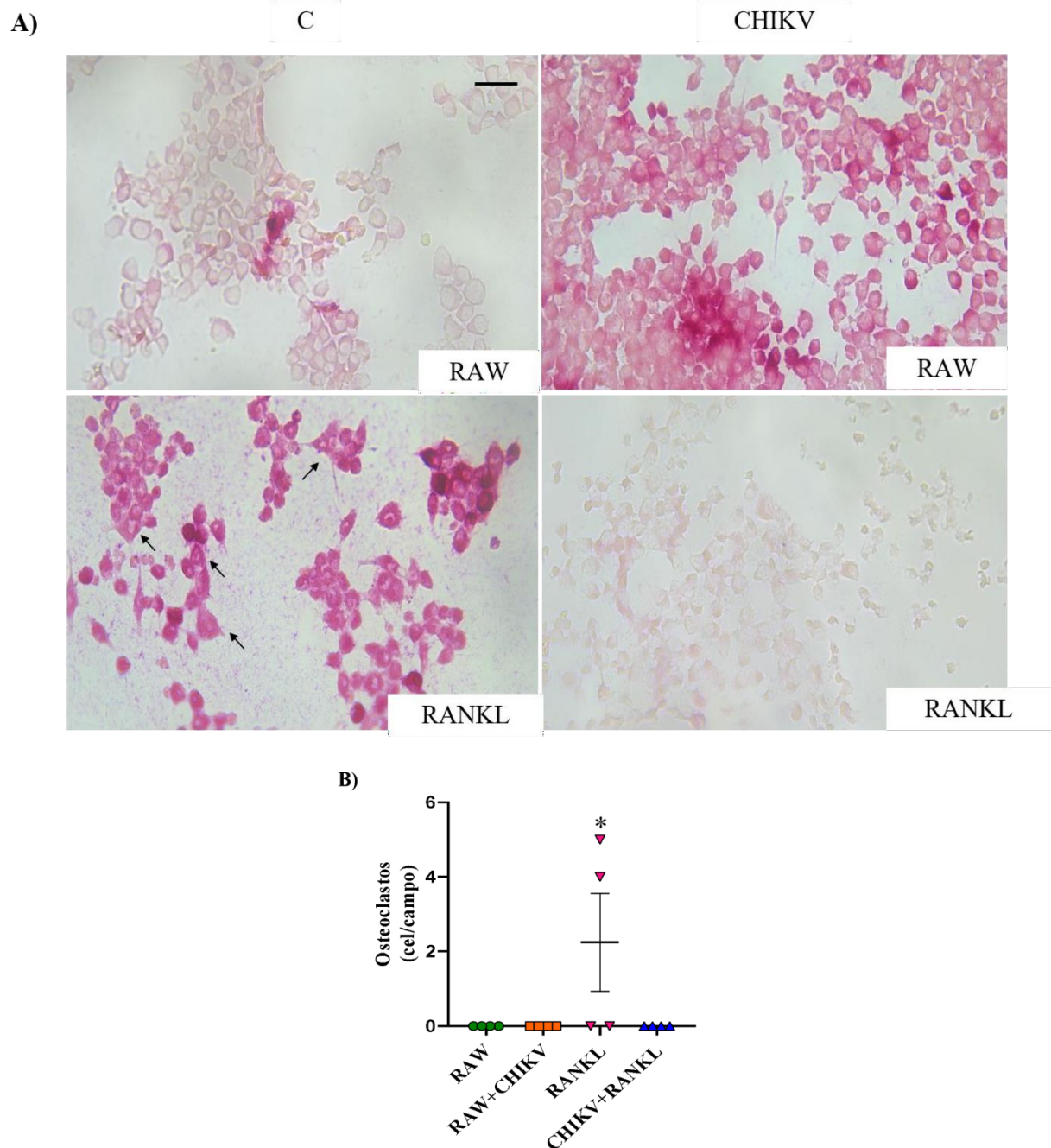


Figura 10. Avaliação da infecção na osteoclastogênese. (A) Imagens representativas da análise de TRAP. Osteoclastos indicados pelas setas. Barra = 10 μ m, aumento = 40X. (B) Análise de TRAP, pós-infecção por CHIKV na MOI 0,1. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); # $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos infectados. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

Não foi observada uma indução de osteoclastogênese diretamente por CHIKV. Entretanto, sabe-se que a perda óssea alveolar também está associada à produção de mediadores inflamatórios (revisto por GRAVES *et al.*, 2008). Sendo assim, avaliamos a produção de mediadores inflamatórios, como IL6, CCL2, IFN γ , TNF, e IL10 nos tecidos periodontais 1, 3

ou 7 dpi. Os resultados mostram que houve aumento significativo da produção das citocinas IL6 (Fig. 11A) e CCL2 (Fig. 11B) no tempo de 1 dpi. Foi observado um aumento significativo de IFN γ no 3 dpi (Fig. 11C). Não foi observada diferença na produção de TNF e IL10 nos tempos avaliados (Fig. 11D e 9E).

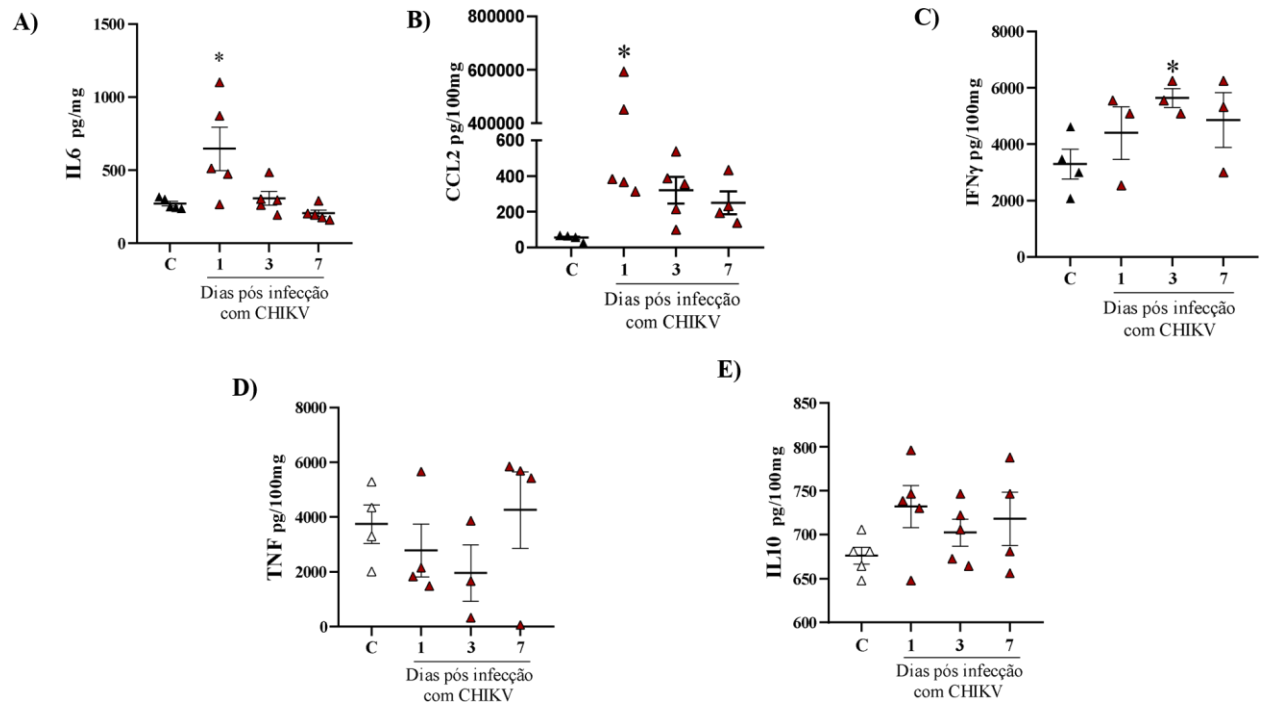


Figura 11. Cinética de produção de mediadores inflamatórios nos tecidos periodontais em camundongos WT. (A) produção de IL-6, (B) CCL2, (C) IFN γ , (D) TNF e (E) IL10 obtida a partir do ELISA. * $p < 0,05$ quando comparados aos camundongos sham-infectados (Controle). A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

Avaliamos se fibroblastos gengivais murinos seriam susceptíveis à infecção por CHIKV e se seriam fonte de mediadores inflamatórios como é observado em fibroblastos sinoviais (PUHKLIA *et al.*, 2013). Os resultados mostram que fibroblastos gengivais murinos são susceptíveis à infecção por CHIKV (Fig. 12A). A recuperação de CHIKV, no sobrenadante, foi observada nos tempos de 24, 48 e 72 h pós-infecção (Fig. 12C). De maneira interessante, a infecção por CHIKV induziu aumento na produção de IL-6 (Fig. 12D); entretanto, não induziu aumento na produção de RANKL, CCL2, TNF e IL10 (Fig. 12E, 12F, 12G e 12H).

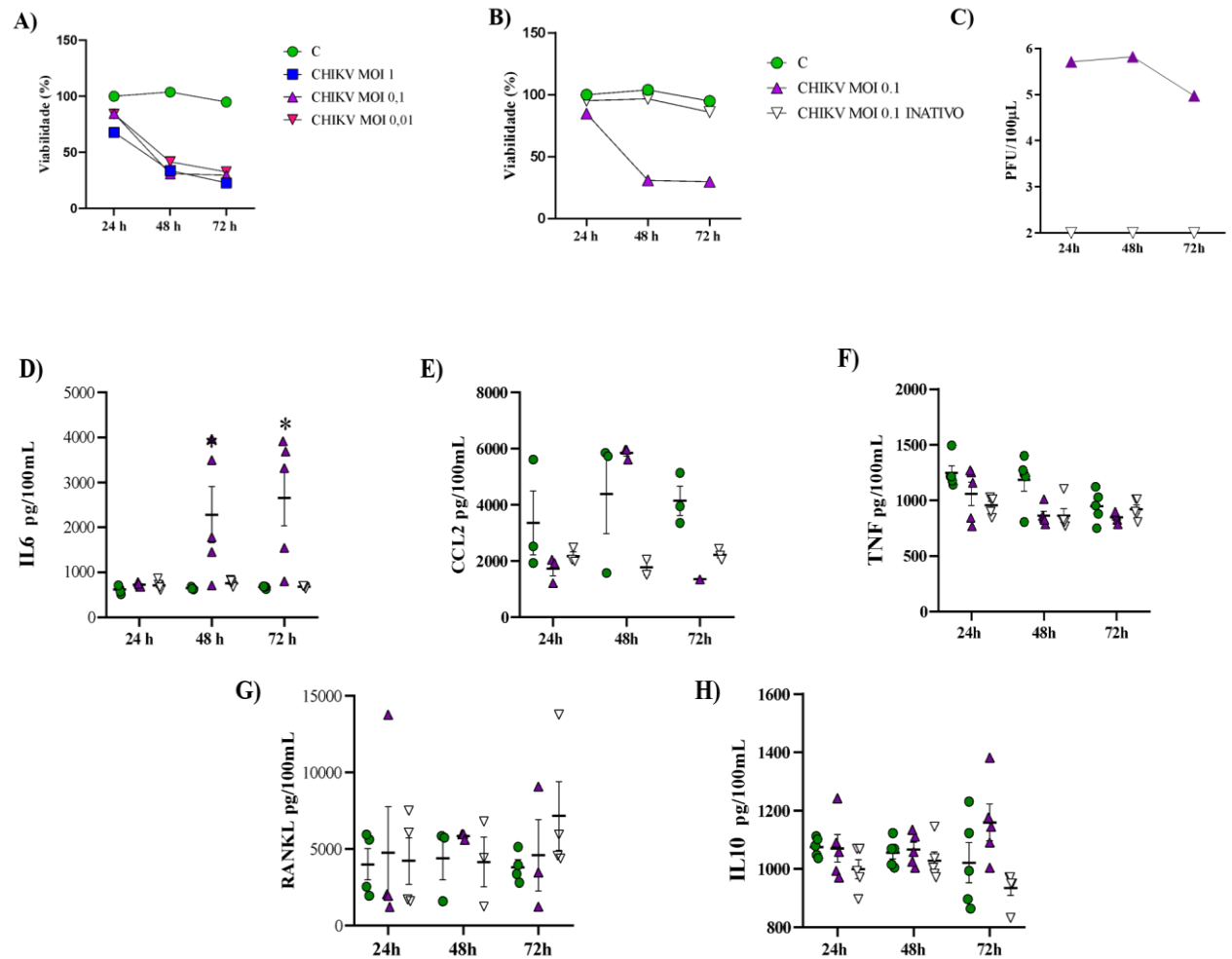


Figura 12. Avaliação da infecção em fibroblastos bucais murinos in vitro. (A) Avaliação da viabilidade celular em diferentes MOI, 24, 48 ou 72 horas pós infecção. (B) Avaliação da viabilidade celular na MOI de 0,1 em 24, 48 ou 72 horas após infecção. (C) Quantificação do título viral no sobrenadante de fibroblastos. (D, E, F, G, H) produção de citocinas em sobrenadante obtida a partir do ELISA. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle). A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls.

Estudos mostram que a citocina IL6 é um importante mediador na infecção por CHIKV (CHOW *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2009). Assim, avaliamos se IL6 possui participação na indução da perda óssea induzida pela infecção por CHIKV. Os resultados mostram que, apesar de ser observado menor título viral em animais deficientes para o receptor de IL6 3 d.p.i (Fig. 13A),

não foi observada alteração na hipernocicepção desses animais, quando comparados aos animais WT (Fig.13B). Entretanto, animais *Il6r*^{-/-} não apresentaram fenótipo de perda óssea alveolar frente a infecção por CHIKV (Fig.14A e 14B).

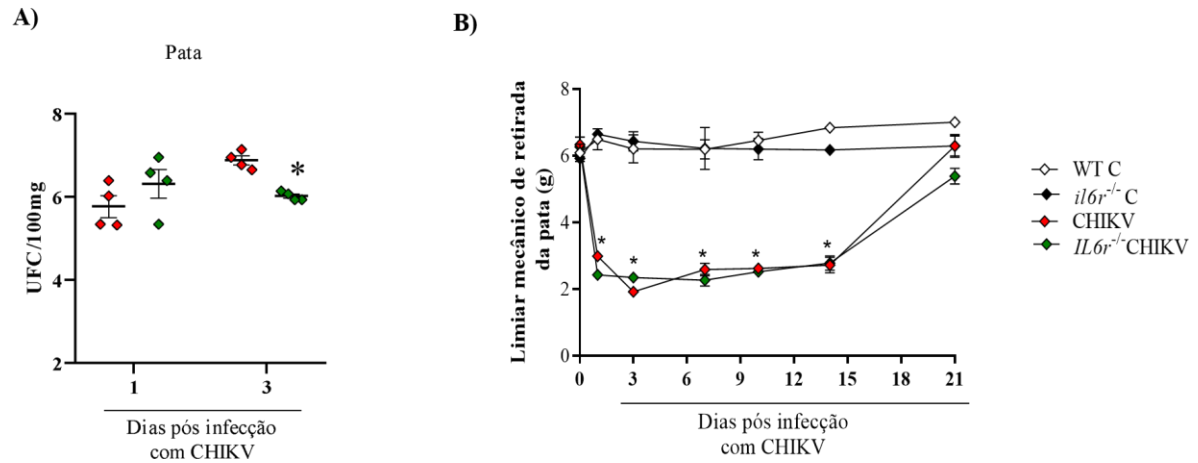


Figura 13. Análise de título viral na pata e cinética de hipernocicepção em animais WT e *Il6r*^{-/-}. (A) Recuperação viral da pata por titulação. (B) Cinética de hipernocicepção articular em camundongos WT e *Il6r*^{-/-} por o teste de medida de pressão eletrônica modificado para camundongos (Von Frey eletrônico). * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle). A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, pós teste Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de *Student* não pareado.

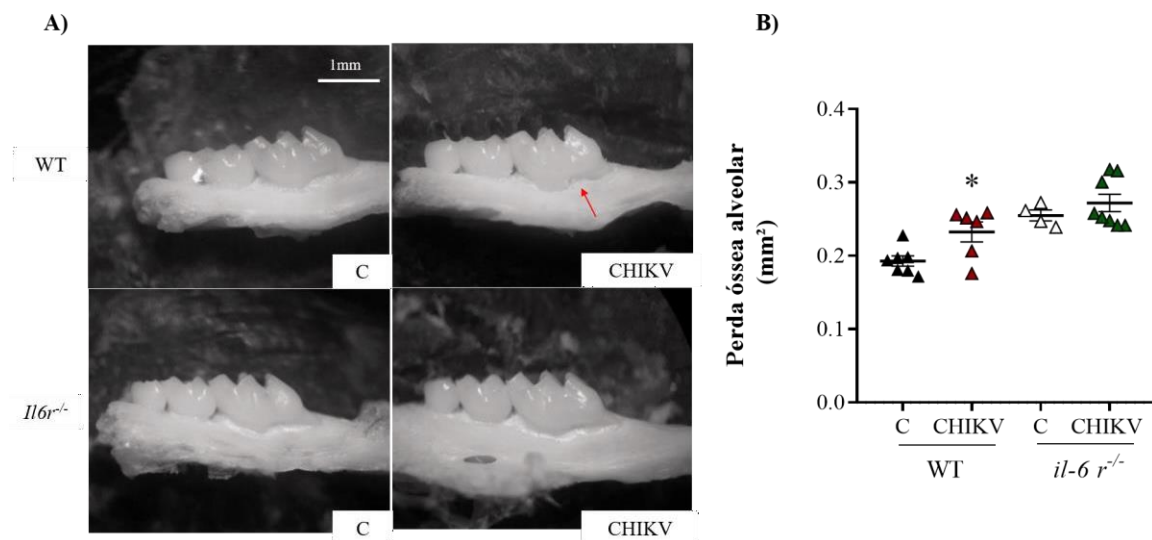
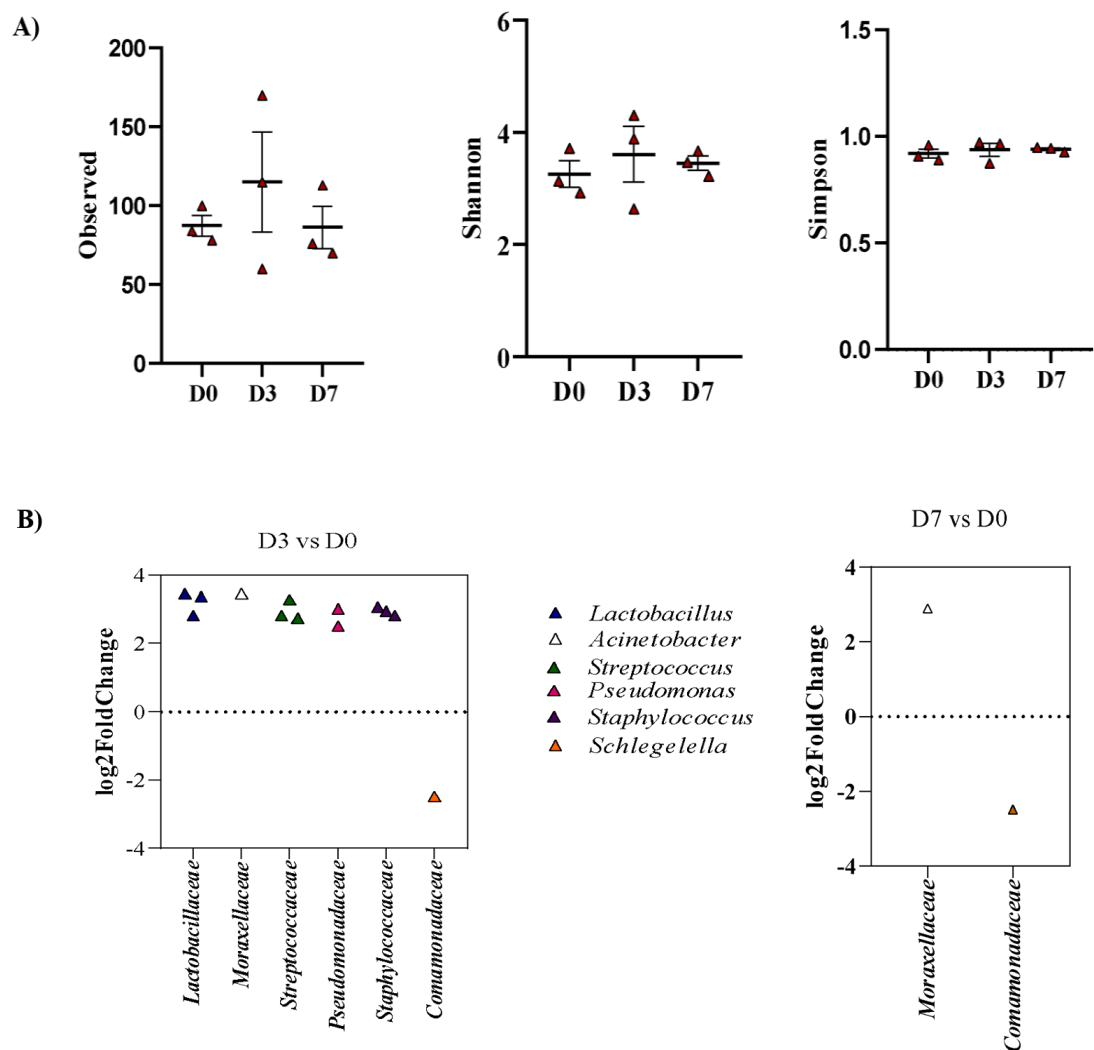


Figura 14. Análise de perda óssea alveolar em animais WT e *Il6r*^{-/-} d.p.i. (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. Indicada pela seta. Escala = 1 mm. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. * $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos sham-infectados (Controle); # $p < 0,05$ quando comparados aos camundongos *Il6r*^{-/-}. A análise estatística foi realizada com teste t de *Student* não pareado.

Processos inflamatórios induzem alterações na microbiota bucal (IDRIS *et al.*, 2017) e esta, por sua vez, possui importante papel nos processos associados à perda óssea alveolar (STEFANO *et al.*, 2022). Para avaliar uma possível interferência da microbiota bucal nas

alterações periodontais associadas à infecção por CHIKV, foi realizada análise da composição da microbiota oral pós-infecção viral via intraplantar. Nossos resultados demonstram que a infecção viral não foi capaz de induzir alteração na diversidade alfa na microbiota (Fig. 15A), apesar de ser possível observar a ascensão de algumas famílias microbianas 3 dpi e com menor número de indivíduos 7 dpi (Fig.15B). Já na ausência de microbiota, animais (*germ free* - GF) e CD1 submetidos a infecção demonstram que camundongos GF infectados via intraplantar com CHIKV não apresentam perda óssea alveolar (Fig. 15C e 15D).



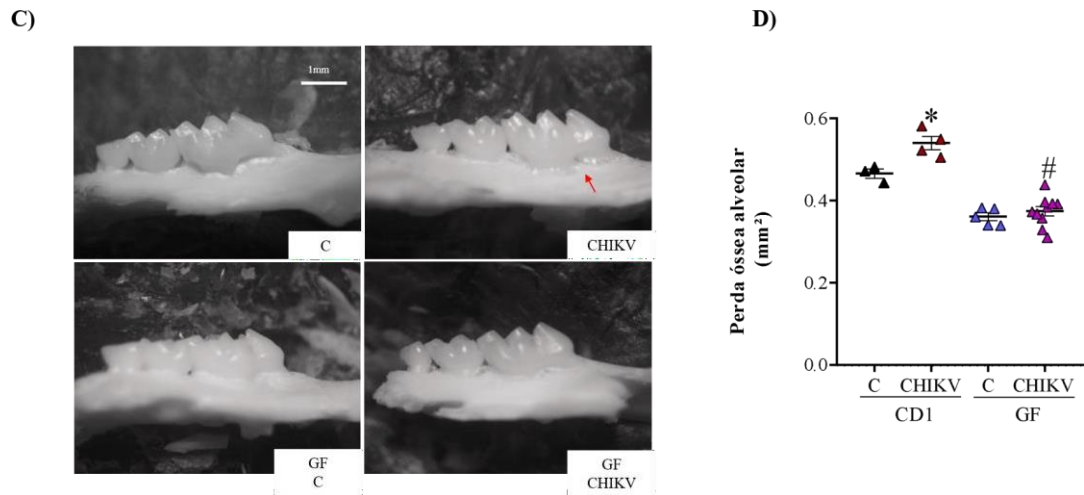
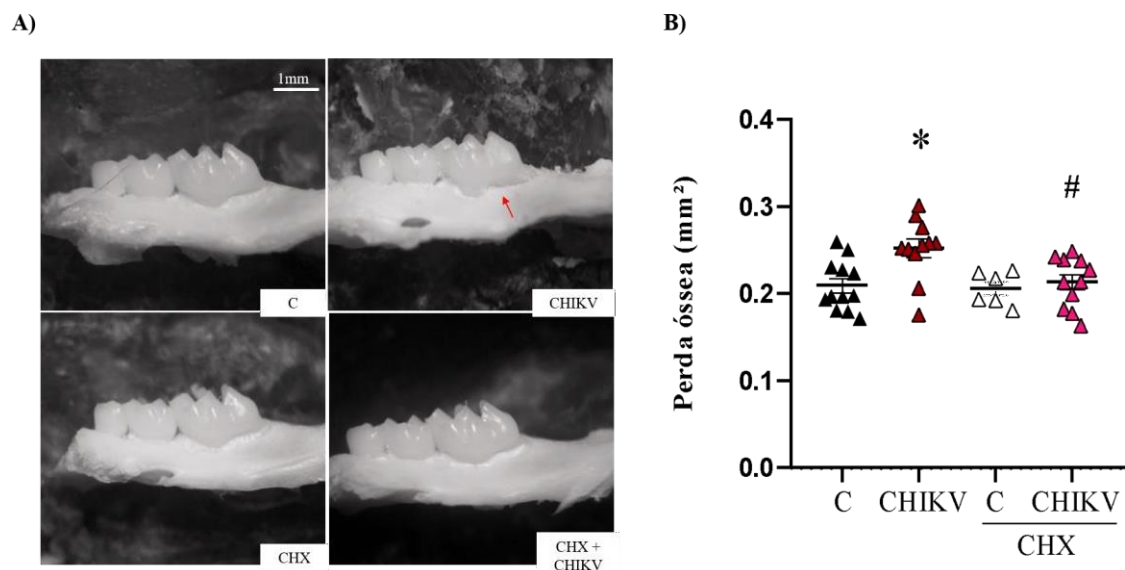


Figura 15. Análise da microbiota bucal na infecção por CHIKV. (A) Gráfico de diversidade alfa (B) Gráfico de alteração populacional de microrganismos na cavidade bucal. (C) Imagens representativas da perda óssea alveolar. Indicada pela seta. (D) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. Escala = 1 mm. A análise estatística foi realizada com teste t de *Student* não pareado.

Além disso, foram realizadas aplicações tópicas de CHX na cavidade bucal dos camundongos, um antisséptico utilizado na prática clínica odontológica para controle da microbiota bucal (BESCOS *et al.*, 2020). Os resultados mostram que a aplicação tópica de CHX não interferiu no título viral (Fig. 16A). Entretanto, a aplicação tópica de CHX na cavidade bucal impediu a perda óssea alveolar associada à infecção por CHIKV (Fig. 16B), associada à ausência do aumento no número de osteoclastos presentes na crista óssea alveolar (Fig. 16C e 16D). Aplicação tópica com CHX não induziu alterações na recuperação de título viral dos tecidos avaliados (Fig. 16E).



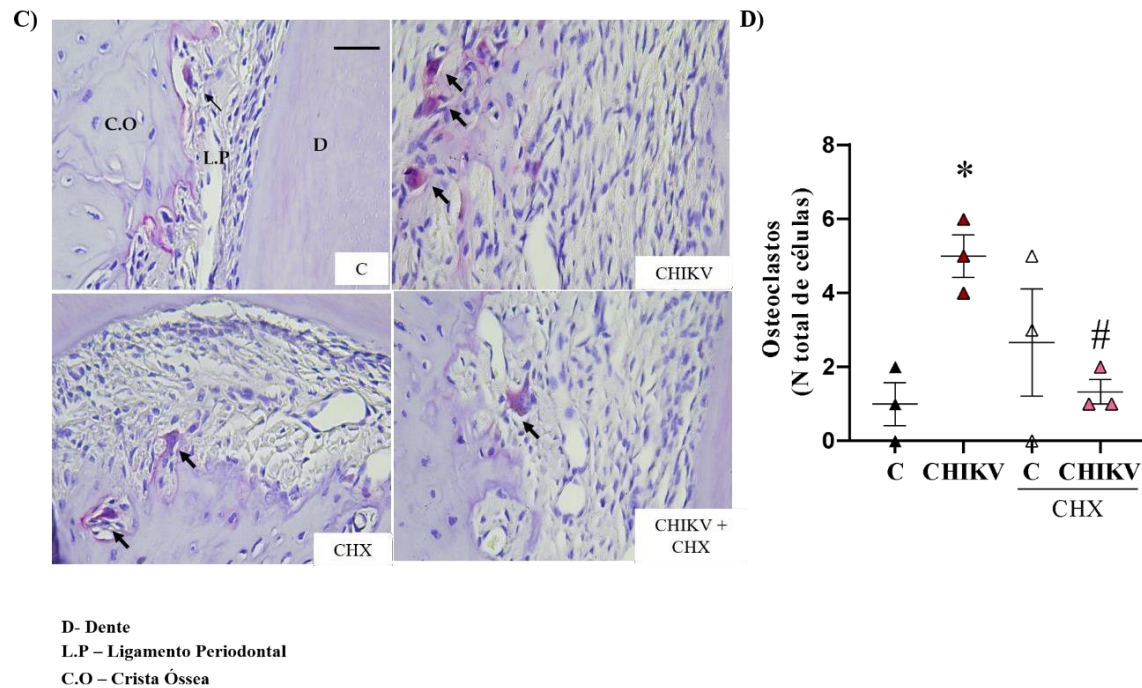


Figura 16. Análise de alterações periodontais em animais submetidos a aplicação tópica por CHX. (A) Imagens representativas da perda óssea alveolar. Indicada pela seta. Escala = 1 mm. (B) Quantificação da perda óssea alveolar obtida pela medida da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) na região palatina do primeiro molar superior. (C) Células TRAP positivas presentes no tecido periodontal. Indicadas pelas setas. Barra = 10µm, aumento = 40X. (D) Quantificação de células TRAP positivas totais no tecido avaliado. # $p < 0,05$ quando comparado aos camundongos infectados. A análise estatística foi realizada com teste t de *Student* não pareado.

6. Discussão

Os resultados deste trabalho mostram que após a infecção via intraplantar por *Chikungunya virus* (CHIKV) em animais WT, CHIKV foi recuperado no soro, em tecidos periodontais e nos tecidos adjacentes. Além disso, a infecção induziu reabsorção óssea alveolar relacionada ao aumento de células TRAP⁺ associadas ao osso alveolar. Este aumento da perda óssea alveolar

não ocorreu por ação direta de CHIKV nos osteoclastos, uma vez que *in vitro* não foi observada a indução da formação de osteoclastos. Entretanto, a infecção viral induziu, nos tempos iniciais pós-infecção, um aumento da produção de IL6, CCL2, IFN γ e RANKL nos tecidos periodontais, e a diminuição da produção de OPG em tempos mais tardios. Nos fibroblastos gengivais, que são células importantes na fisiologia óssea periodontal (CLAEYS *et al.*, 2020), não foi observado um aumento da produção de RANKL, mas foi observado um aumento na produção de IL6, um importante mediador na indução de perda óssea alveolar (FENG *et al.*, 2017). Além disso, foi observado também um papel importante da microbiota bucal na perda óssea alveolar induzida por CHIKV.

ZHANG *et al.* (2019) e KAM *et al.*, 2009 mostraram que houve uma disseminação de CHIKV para diversos tecidos, como fígado, baço e cérebro em camundongos, após a infecção por CHIKV via intraplantar, apontando assim para um caráter sistêmico desta infecção. Uma vez que CHIKV é capaz de infectar monócitos e assim utilizá-los como um “cavalo de Troia”, levando o vírus para diversos sítios, como os citados anteriormente e que, posteriormente, esses sítios servirão de reservatório para CHIKV (HER *et al.*, 2010). Desse modo, o presente estudo mostra que ocorre processo de viremia ao recuperar vírus do soro dos animais 1dpi o mesmo é observado por PAROLA *et al.* (2009) ao detectar material genético de CHIKV em amostras de sangue de pacientes infectados. Além disso, neste mesmo tempo é observado infecção da glândula salivar de camundongos. Em pacientes infectados é demonstrado a presença de material genético de CHIKV em amostras de saliva (MUSSO *et al.*, 2016; GARDNER *et al.*, 2015), sugerindo que a glândula salivar de pacientes infectados é acometida pela infecção viral, sabe-se que CHIKV possui tropismo por células acinares, localizadas no ducto salivar central das glândulas salivares (VEGA-RUÁ *et al.*, 2015). Foi observado que nos tempos de 1 e 3 dpi recuperação de partículas virais do masseter e dos tecidos periodontais dos animais. Apesar de não ter trabalhos disponíveis que demonstrem a infecção de CHIKV nesses sítios. É sabido que CHIKV possui tropismo por células componentes do masseter, como mieloblastos (LOHACHANAKUL *et al.*, 2015) e células satélites que servem de reservatório para CHIKV (JAQUET *et al.*, 2024) e dos tecidos periodontais, como fibroblastos (YOUNG *et al.*, 2019).

A perda óssea alveolar observada a partir de 7 dpi não progrediu nos tempos subsequentes, mantendo os níveis iniciais de reabsorção óssea. Um estudo feito por CHEN *et al.* (2015) mostrou que camundongos C57BL/6 infectados por CHIKV apresentaram perda óssea em ossos longos como a tíbia, 3 d.p.i., corroborando a capacidade da infecção por CHIKV de induzir alterações ósseas. Este fenótipo pode estar associado a degradação da matriz óssea por

osteoclastos (BOYCE; YAO; XING, 2009). Essas células em um ambiente pró osteoclastogênese tem seu número bem como sua atividade de reabsorção óssea aumentados (MADEIRA et al., 2017). De maneira interessante, em nosso modelo experimental também foi observado o aumento do número de células TRAP⁺ associadas à crista óssea alveolar. *In vitro*, é observado que infecções por arbovírus são capazes de induzir a osteoclastogênese (HUANG et al. 2016). Entretanto, haja visto que a infecções causadas por alguns arbovírus como o *Zika virus* (ZIKV), há o bloqueio da osteoclastogênese (MUMTAZ et al. (2022). Nossos resultados, *in vitro*, demonstram que a infecção por CHIKV não induziu alterações na indução de osteoclastogênese, sendo observada perda de viabilidade dessas células no sistema utilizado.

O aumento do número de osteoclastos está associado também ao intenso processo inflamatório observado no tecido periodontal, que induz o aumento da expressão e produção de citocinas osteoclastogênicas como IL6 e RANKL (revisto por GRAVES, 2008). Durante o processo inflamatório, a atividade e formação de osteoclastos são aumentadas, como é descrito por MADEIRA et al. (2017), em um modelo experimental murino de DP induzida por *A. actinomycetemcomitans*. Nossos dados demonstram que a presença de CHIKV nos tecidos periodontais induz o aumento da produção de mediadores como IL6, CCL2, IFN γ , RANKL, menor produção de OPG e desbalanço na razão RANKL/OPG. Da mesma forma, em outros modelos murinos, como o de indução de DP por inserção de ligadura, em associação ou não a inoculação de *P. gingivalis* (SIDDIQUI et al., 2023; BI et al., 2023) foi observado o aumento de IL6 e RANKL. Além disso, CHEN et al. (2014) demonstraram que pacientes infectados por CHIKV apresentaram alterações nos níveis séricos de RANKL e OPG, o que não foi observado em camundongos. RANKL também é encontrado em altas concentrações na saliva de pacientes acometidos por DP (OCHANJI, A.A.; MATU, N.K.; MULLI, T.K., 2017). Um estudo feito por PHUKLIA et al. (2013) mostrou que fibroblastos sinoviais, frente à infecção por CHIKV, induziram a diferenciação de células CD14⁺ em células tipo osteoclastos, associada à produção de RANKL e IL-6. Os fibroblastos, além de serem células fonte de RANKL (WEI et al., 2005), importante fator indutor de formação e ativação de osteoclastos (PARK; LEE; LEE, 2017), são também células importantes para o processo infeccioso associado a CHIKV, podendo ser reservatórios virais (YOUNG et al., 2019). Corroborando este trabalho, nossos resultados mostram que fibroblastos gengivais de camundongos são susceptíveis à infecção por CHIKV e são fonte de IL-6. Já foi demonstrado que IL-6 induz a formação de osteoclastos por uma via indireta, induzindo o aumento de RANKL por osteoblastos (FENG, W; GUO, J.; MINQI, L.,

2019). Um estudo de um caso letal de febre Chikungunya realizado por COLAVITA *et al.* (2018) mostrou uma “superprodução” de IL-6 na amostra de plasma do paciente. A produção de IL-6 tem sido associada também à persistência da artralgia na infecção por CHIKV (NG *et al.*, 2009; CHOW *et al.*, 2011). Por outro lado, IL-6 também é um mediador importante no contexto da inflamação periodontal (FENG; GUO; MINQI, 2019; KOSHY *et al.*, 2019; DÍAZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2019; MOKEEM *et al.*, 2018). Nossos dados mostram que animais *knockout* para o receptor de IL-6 infectados com CHIKV apresentam menor título viral 3 d.p.i, no local da infecção. Entretanto, a presença de menor concentração de CHIKV não alterou a hipernocicepção avaliada. Dessa forma, a ausência deste receptor não interferiu na infecção local. Entretanto, como análise de um reflexo sistêmico da infecção, ao avaliar a perda óssea alveolar, foi observado que os animais *il6r^{-/-}* não apresentaram desenvolvimento do fenótipo. Indicando sua participação na perda óssea alveolar no modelo experimental. Sugerindo este receptor é um importante fator na indução da osteoclastogênese. Haja visto que em ossos longos é observado que este mediador apresenta papel importante ao ser observado que na sua ausência de alterações ósseas associadas a um menor número de osteoclastos presentes no tecido ósseo (ZHU *et al.*, 2018). Demonstrando assim que IL6 apresenta papel importante durante alterações ósseas associadas a processos inflamatórios.

Alguns estudos demonstram que a microbiota de camundongos, assim como a microbiota de seres humanos e outros mamíferos, exerce papel importante em processos inflamatórios (SOUZA, DG *et al.*, 2004; HONDA *et al.*, 2016; BELKAID; HAND, 2014; MENG *et al.*, 2022), incluindo a inflamação periodontal (STEFANO *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2018). Outros estudos mostram que a microbiota humana é um fator importante nas infecções virais, uma vez que alterações na microbiota estão associadas a uma piora do quadro (revisto por HARPER *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2019). Também pode haver o acometimento de um quadro patológico secundário à infecção viral, como o câncer cervical associado à infecção por Papilomavírus Humano (HPV) (revisto por MIZUTANI *et al.*, 2022). Os nossos resultados mostram que a infecção por CHIKV induziu alterações na microbiota bucal dos animais com ascensão de microrganismos pertencentes às famílias Lactobacillaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae e diminuição daqueles pertencentes à família Comamonadaceae, 3 dias pós infecção. Sete dias pós infecção a microbiota apresentou menores alterações populacionais. Sabe-se que microrganismos pertencentes a família Lactobacillaceae são bactérias Gram-positivas colonizadoras de diversos sítios de vertebrados, incluindo a cavidade bucal, cujo aumento neste sítio está intimamente associado a quadros de

cárie (MUNSON *et al.*, 2004). Já os membros da família Staphylococcaceae são cocos Gram-positivos presentes na microbiota bucal de indivíduos saudáveis, entretanto, já foi mostrado um aumento significativo de sua incidência em bolsas periodontais em indivíduos com periodontite (LOBERTO *et al.*, 2004; CUESTA, *et al.*, 2010). Os membros da família Pseudomonadacea são comumente associados ao grupo de bactérias resistentes a múltiplas drogas “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp) (revisto por OLIVEIRA, D.M.P. *et al.*, 2020). Entretanto, SANTOS *et al.* (2002) observaram que membros da família Pseudomonadacea são comumente isolados de bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica. Juntamente com os membros da família Pseudomonadacea, os membros pertencentes à família Moraxellaceae estão presentes na composição da microbiota de crianças durante a dentição decídua (CRIELAARD *et al.*, 2011). Foi observado que a infecção pelo CHIKV induziu a diminuição da família Comamonadacea. WANG *et al.* (2023) observaram que pacientes que apresentavam quadro de DP e diabetes mellitus do tipo 2 apresentaram menor número de membros da família Comamonadaceae quando comparados aos pacientes que apresentavam apenas quadro de DP.

A infecção por CHIKV na ausência de microbiota, em animais GF, não induziu perda óssea alveolar. De maneira semelhante, os animais que foram submetidos a manipulação da microbiota bucal a partir da aplicação tópica de CHX, não apresentaram perda óssea alveolar. Também não foi observado um aumento do número de células TRAP+ positivas associadas à crista óssea alveolar nos camundongos submetidos à aplicação tópica de CHX na cavidade bucal. Um estudo feito por KUO *et al.* (2023) demonstrou que ratos Sprague–Dawley machos submetidos à ligadura e a aplicações tópicas por CHX na cavidade bucal apresentam menor perda óssea alveolar, quando comparados ao grupo que não foi submetido a aplicação de CHX, associado ao menor número de células TRAP+ presentes no periodonto dos ratos, bem como menor produção de RANKL, menor infiltrado inflamatório. Observaram também alterações significativas na microbiota bucal dos ratos com ascensão de bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Alistipes*, *Clostridium*, *Parabacteroids* e *Bifidobacterium*. No presente estudo, a infecção por CHIKV induziu alterações na composição da microbiota bucal, resultando em uma disbiose. Logo, os nossos resultados mostram que os danos ósseos periodontais associados à infecção por CHIKV estão relacionados à disbiose bucal, demonstrando um papel importante das populações microbianas bucais neste contexto.

7. Considerações finais

Os resultados deste trabalho demonstram que a infecção via intraplantar por CHIKV induz perda óssea alveolar. Este fenótipo está associado a um processo de osteoclastogênese associado a um processo inflamatório com participação importante da citocina IL6 que, por sua vez, pode estar associado às alterações na microbiota bucal induzidas pela infecção viral. A ascensão de populações microbianas que podem estar associadas a quadros de DP em pacientes somada à presença da IL6 nos tecidos periodontais parecem apresentar um sinergismo conduzindo para que o ambiente periodontal se torne pró osteoclastogênese resultando no fenótipo de perda óssea alveolar observada no modelo experimental.

8. Referências

- AHLSTRAND, T. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS binds human interleukin-8. *Journal of Oral Microbiology*. v.11, n.1, 2019.
- AKIRA, S., TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. v.2, p.675–680, 2001.
- ALETAHA, D.; SMOLEN, J.S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *JAMA*. v.320, n.13, 2018.
- AMDEKAR, S.; PARASHAR, D.; ALAGARASU, K. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. *Viral Immunology*. v.30, n.10, p.691–702, 2017.
- ANDO-SUGUIMOTO, E. S. et al. The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. *Cytokine*. v.66, n.1, p.46–53, 2014.
- ARANCIBIA, S.A. et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biological Research*. v.40, n.2, 2007.
- ARIGBEDE A.O.; BABATOPE B.O.; BAMIDELE, M.K. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *J Indian Soc Periodontol*. v.16, n.4, p.487–491, 2012.
- BANDYOPADHYAY, D.; GHOSH, S.K. Mucocutaneous manifestations of Chikungunya fever. *Indian journal of dermatology*. v.55, n.1, 2010.
- BARROS, S.P. et al. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*. v.70, n.1, p.53-64, 2016.
- BELIBASAKIS, G. N. et al. Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Cytokine*. v.30, n.2, p.56–63, 2005.
- BELIBASAKIS, G.N; BOSTANCI, N. Inflammatory and bone remodeling responses to the cytolethal distending toxins. *Cells*. v.3, n.2, 2014.
- BELIBASAKIS, G.N; BOSTANCI, N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. v.39, p.239-248, 2012.
- BEZERRA, M.C. et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res*. v. 38, n. 2, p. 161-170, 2005.
- BOYCE, B.F.; XING, L. Funções de RANKL / RANK / OPG na modelagem e remodelação óssea. *Arquivos de bioquímica e biofísica*. v. 473, n.2, 2008.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico—Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 42 de 2018. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. v.49, 2018. Acessado em 09/2020.

BRASIL. Boletim Epidemiológico—Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. v.48, 2017. Acessado em 09/2020.

BRASIL. Boletim Epidemiológico—Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. v.55, 2024. Acessado em 07/2024.

BRÍGIDO, J.A. et al. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. v.19, n.2, 2014.

CDC. Arthritis Types, 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/arthritis/basics/types.html>> Acesso em: 06 de março de 2020.

CEKICI, ALI et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. v. 64, n.1, p.57-80, 2014.

CERVANTES-ACOSTA, G.; SANJUÁN-VERGARA, H. Virus chikungunya: Características virales y evolución genética. *Salud Uninorte*. v. 32, n.2, p.292-301, 2016.

CHEN, J. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome medicine*. v. 8, n.1, 2016.

CHEN, W. et al. Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss induced by *Chikungunya* virus infection. *Journal of virology*. v.89, n.1, 2015.

COCHRAN, D. L. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*. v.79, n.8, 2008.

CORRÊA, J. D. et al. Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. *Anaerobe*, v.39, p.91–96, 2016.

CORRÊA, J.D., FERNANDES, G.R., CALDERARO, D.C. et al. Oral microbial dysbiosis linked to worsened periodontal condition in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep*. v.9, n.8379, 2019.

CUNHA, R.V. DA; TRINTA, K.S. *Chikungunya virus*: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 112, n.8, p.523-531, 2017.

DAMEK-POPRAWA, M et al. Cell junction remodeling in gingival tissue exposed to a microbial toxin. *Journal of dental research*. v. 92, n.6, 2013.

DANFORTH, D.R. et al. A Nonfimbrial Adhesin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Mediates Biofilm Biogenesis. *Infection and immunity*. v.87, n.1, 2018.

DARRAH, E. ; ANDRADE, F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Current opinion in rheumatology*. v. 30, n.1, 2018.

- DE SOUZA, S.; BANSAL, R.; GALLOWAY, J. Managing patients with rheumatoid arthritis. *BDJ Team*. v.4, 2017.
- DEL FATTORE, A.; TETI, A.; RUCCI, N. Osteoclast receptors and signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.473, n.2, p.147–160, 2008.
- DELGADO-ORTEGA M, MARC D, DUPONT J, TRAPP S, BERRI M, MEURENS F. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. *Vet Immunol Immunopathol*. Jan 15;151(1-2):1-19, 2013.
- DOMINY, S.S. et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *SCIENCE ADVANCES*. v.5, n.1, 2019.
- DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS neglected tropical diseases*. v. 6, n.3, 2012.
- DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS neglected tropical diseases*. v.6, n.3, 2012.
- FITZGERALD, K.A.; KAGAN, J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020.
- FRENCKEN, J.E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. n.44, 2017.
- GALÁN-HUERTA, K.A. et al. *Chikungunya virus*: A general overview. *Medicina Universitaria*. v.17, n.68, p.175-183, 2015.
- GARLET GP, CARDOSO CR, CAMPANELLI AP, MARTINS W JR, SILVA JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res*. Dec;41(6):580-4, 2006.
- GASQUE, P. et al. Chikungunya Pathogenesis: From the Clinics to the Bench, *The Journal of Infectious Diseases*, v.214, n.5, p.446-448, 2016.
- GIBERTONI, F. et al. Evolution of Periodontal Disease: Immune Response and RANK/RANKL/OPG. System. *Braz. Dent. J*. v.28, n.6, 2017.
- GÓMEZ-BAÑUELOS, E. et al. Rheumatoid Arthritis-Associated Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.” *Journal of Clinical Medicine*. v. 8, n.9, 2019.
- GUSTAFSSON, N. et al. Associations among Periodontitis, Calcified Carotid Artery Atheromas, and Risk of Myocardial Infarction. *Journal of Dental Research*. v. 99, n. 1, p. 60–68, 2019.
- HAJISHENGALLIS, G. et al. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Seminars in immunology*. v.28, n.2, 2016.

- HERRMANN, J. M.; MEYLE, J. Neutrophil activation and periodontal tissue injury. *Periodontology* 2000. v. 69, n.1, p.111–127, 2015.
- HIRSCHFELD, J. Neutrophil Subsets in Periodontal Health and Disease: A Mini Review. *Front. Immunol.* 2020.
- HUANG, N.; GIBSON, F.C. 3rd. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Current oral health reports.* v. 1, n.2, p.124-132, 2014.
- INAGAKI-OHARA K, KONDO T, ITO M, YOSHIMURA A. SOCS, inflammation, and cancer. *JAKSTAT.* Jul 1;2(3):e24053. 2013.
- INGAR, O.; AMANO, A. Outer membrane vesicles - offensive weapons or good Samaritans?. *Journal of oral microbiology.* v. 7, 2015.
- IQBAL, S.; RATTU, M.A.; SHAH, N. Review of Rheumatoid Arthritis. *US Pharm Specialty&Oncology.* v.44, n.1, 2019.
- KACHLANY, S.C. et al. *flp-1*, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Molecular Microbiology.* v.40, p.542-554, 2001.
- KAJI, H. et al. Prostaglandin E2 stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: Role of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* vol. 11,1 (1996): 62-71.
- KAM, Y.W. et al. Early appearance of neutralizing immunoglobulin G3 antibodies is associated with *chikungunya* virus clearance and long-term clinical protection. *The Journal of Infectious Diseases.* v.205, n.7, 2012.
- KAPLAN, J.B. et al. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infection and immunity.* v.69, n.9, 2001.
- KATTI, R.; SHAHAPUR P.R.; UDAPUDI, K.L. Impact of *Chikungunya* virus infection on oral health status: An observational study. *Indian J Dent Res.* v. 22, n. 4, p. 613, 2011.
- KAWAI, T. et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology.* v. 169, n.3, 2006.
- KEITH P. MINTZ, K.P.; FIVES-TAYLOR, P.M. Identification of an Immunoglobulin Fc Receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and immunity.* v.62, n.10, p. 4500-4505, 1994.
- KELK, P et al. Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infection and immunity.* v.71, n.8, 2003.
- KERSHAW NJ, MURPHY JM, LIAU NP, VARGHESE LN, LAKTYUSHIN A, WHITLOCK EL, LUCET IS, NICOLA NA, BABON JJ. SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to

control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Apr;20(4):469-76.

KESIĆ, L. et al. The importance of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in etiology of periodontal disease - mini review. *Acta Medica Medianae.* v.48, n.3, p. 35-37, 2009.

KHARLAMOVA, N. et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis & Rheumatology.* v.68, p.604-613, 2016.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* v.142, n.12, 2001.

KIM, T.-S. et al. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Patients With Different Ethnic Backgrounds. *Journal of Periodontology.* v.80, p.2020-2027, 2009.

KINANE, D.; STATHOPOULOU, P.; PAPAPANOU, P. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017.

KOBAYASHI, Y. et al. Prostaglandin E2 Enhances Osteoclastic Differentiation of Precursor Cells through Protein Kinase A-dependent Phosphorylation of TAK1. *Journal of Biological Chemistry.* v.280, n.12, p.11395–11403, 2005.

KONIG, M. F. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine.* v.8, n.369, 2016.

KONIG, M.F. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine.* v.8, n.369, 2016.

LEAO, J. et al. *Chikungunya* fever: General and oral healthcare implications. *Oral Diseases.* v.24, n.1-2, p. 233–237, 2018.

LEE, W.W.L. et al. Expanding regulatory T cells alleviates chikungunya virus-induced pathology in mice. *Journal of virology.* v. 89, n.15, 2015.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. *The Lancet.* v. 383, n. 9916, 2014.

LEUNG, J.Y.S.; NG, M.M.L.; CHU, J.J.H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Advances in Virology.* 2011.

LI, X. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. *Journal of Cellular Biochemistry.* v.113, n.9, p.2822–2834, 2012.

LIU S, LIAO Y, CHEN B, CHEN Y, YU Z, WEI H, ZHANG L, HUANG S, ROTHMAN PB, GAO GF, CHEN JL. Critical role of Syk-dependent STAT1 activation in innate antiviral immunity. *Cell Rep.* Jan 19;34(3):108627, 2021.

LUM, F.M. et al. An essential role of antibodies in the control of Chikungunya virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* v. 190, n.12, 2013.

- MADEIRA, M. F. M. et al. MyD88 is essential for alveolar bone loss induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide in mice. *Molecular Oral Microbiology*. v.28, n.6, p.415–424, 2013.
- MARIANO, F.S. et al. The role of immune system in the development of periodontal disease: a brief review. *Rev. odonto ciênc.* v. 25, n. 3, p. 300-305, 2010.
- MARKS, M.; MARKS, J.L. Viral arthritis. *Clinical medicine (London, England)*. v.16, n.2, 2016.
- MATSUMOTO A, MASUHARA M, MITSUI K, YOKOUCHI M, OHTSUBO M, MISAWA H, MIYAJIMA A, YOSHIMURA A. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*. 89:3148–54, 1997.
- MATTILA, K. J.; PUSSINEN, P. J.; PAJU, S. Dental Infections and Cardiovascular Diseases: A Review. *Journal of Periodontology*. v.76, n.11, 2005.
- MAYADAS, T.N.; CULLERE, X.; LOWELL, C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. v.9, p.181–218, 2014.
- MENEZES R, GARLET TP, TROMBONE AP, REPEKE CE, LETRA A, GRANJEIRO JM, CAMPANELLI AP, GARLET GP. The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod*. Dec;34(12):1480-4, 2008.
- MINER, J.J. et al. Chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*. v.67, n.5, 2015.
- Mineral Research*. v.11, n.1, p.62–71, 2009.
- MOBEEN, N. Oral Manifestation of *Chikungunya* and Dengue Fever. *J. Pharm. Sci. & Res.* v. 7, n.9, p. 769-771, 2015.
- MOSTAFAVI, H. et al. Arthritogenic alphavirus-induced immunopathology and targeting host inflammation as a therapeutic strategy for alphaviral disease. *Viruses*. v. 11, n.3, 2019.
- NAUFEL, A.O. et al. Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review. *Braz. Oral Research*. v. 31, n.103, 2017 .
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, v. 11, n. 2, p. 72–80, 2017.
- NOGUCHI, K.; ISHIKAWA, I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ in periodontal disease. *Periodontology 2000*. v.43, n.1, p.85–101, 2007.
- NUNES, M.R.T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. v.13, n.102 , 2015).
- OHARA, M. et al. Topical application of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest in the rat gingival epithelium in vivo. *Journal of Periodontal Research*. v.46, n.3, p. 389–395, 2011.

PALMA, P. V.; LEITE, I. C. Epidemiology and social inequalities of periodontal disease in Brazil. *Frontiers in public health*. v.2, n.203, 2014.

PAN, W.; WANG, Q.; CHEN, Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. v.11, n.3, 2019.

PAPAPANOU, P.N. et al. Periodontitis: Consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. v.45(Suppl 20): S162– S170, 2018.

PAPATHANASIOU E, KANTARCI A, KONSTANTINIDIS A, GAO H, VAN DYKE TE. SOCS-3 Regulates Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Dent Res*. Aug;95(9):1018-25, 2016.

PARASHAR, D.; CHERIAN, S. Antiviral Perspectives for *Chikungunya* Virus. *BioMed Research International*. p.1–11, 2014.

PAUL, B.J., SADANAND, S. *Chikungunya* Infection: A Re-emerging Epidemic. *Rheumatol Ther*. v.5, p.317–326, 2018.

PERSSON, G. R. Rheumatoid arthritis and periodontitis - inflammatory and infectious connections. Review of the literature. *Journal of oral microbiology*. v. 4, 2012.

PETITDEMANGE, C. et al. Longitudinal Analysis of Natural Killer Cells in Dengue Virus-Infected Patients in Comparison to Chikungunya and Chikungunya/Dengue Virus-Infected Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v.10, n.3, 2016.

PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *Allergy clin immunol*. v.135, n.4, 2015.

PISCHON, N. et al. Association Among Rheumatoid Arthritis, Oral Hygiene, and Periodontitis. *Journal of Periodontology*. v.79, n.6, p.979–986, 2008.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. *Journal of Clinical Periodontology*. v.39, n.7, p. 608–616, 2012.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of chikungunya infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(2), 89–96, 2010.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. v.31, n.5, 2011.

RIYAZ, N. et al. Cutaneous manifestations of *Chikungunya* during a recent epidemic in Calicut, north Kerala, south India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. v.76, n.6, p. 671-676, 2010.

ROJO-BOTELLO, N.R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, A.L.; MORENO-FIERROS, L. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. v. 47, n.1, 62–73, 2011.

- ROQUES, P.; GRAS, G. Chikungunya fever: focus on peripheral markers of pathogenesis. *The Journal of infectious diseases*. v.203, n.2, 2011.
- ROWLAND-JONES, S. L. *Chikungunya*: out of the tropical forests and heading our way. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.110, n.2, p.85–86, 2016.
- ROY, E. et al. *Chikungunya virus* infection impairs osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *bioRxiv*. 2019.
- SCHILTE, C. et al. *Chikungunya virus*-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases* v.7, n.3, 2013.
- SHENKER, B.J. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Immunosuppressive Protein Is a Member of the Family of Cytolethal Distending Toxins Capable of Causing a G₂ Arrest in Human T Cells. *The Journal of Immunology*. v.162, n.8, p.4773-4780, 1999.
- SILVA, J.V.J. et al. A scoping review of *Chikungunya virus* infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control, *Acta Tropica*. v.188, p.213-224, 2018.
- SILVA, L.A.; DERMODY, T.S. *Chikungunya virus*: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*. v.127, n.3, p.737-749, 2017.
- SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J. Appl. Oral Sci*. v. 23, n. 3, p. 329-355, 2015 .
- SIMIÃO, R.A. et al. A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. v.52, 2019.
- SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*. v.4, 2018.
- SMOLEN, J.S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I.B. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. p.2023–2038, 2016.
- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.-C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nature Reviews Rheumatology*. v.8, n.7, p.420–429, 2012.
- SURYAWANSHI, S.D. et al. Clinical profile of chikungunya fever in patients in a tertiary care centre in Maharashtra, India. *Indian J Med Res*. v. 129, p. 438-441, 2009.
- TACHIKAKE-KURAMOTO, M. et al. Lipopolysaccharide derived from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits differentiation of osteoblasts. *Pediatric Dental Journal*. v.24, n.2, p.83–88, 2014.
- VLOTIDES G, SÖRENSEN AS, KOPP F, ZITZMANN K, CENGIC N, BRAND S, ZACHOVAL R, AUERNHAMMER CJ. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 30;320(3):1007-14, 2004.
- XIE, J., WANG, M., CHENG, A. et al. The role of SOCS proteins in the development of virus-induced hepatocellular carcinoma. *Virol J* **18**, 74, 2021.

- TANABE, I.S.B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* v. 8, n.345, 2018.
- TANG, Q. et al. A Possible Link Between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry.* v.37, n.1, p.79–86, 2017.
- TENG, Y.T.A. The Role of Acquired Immunity and Periodontal Disease Progression. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* v. 14, n. 4, p. 237–252, 2003.
- TEO, T.H. et al. Fingolimod treatment abrogates chikungunya virus-induced arthralgia. *Science Translational Medicine.* v. 9, n.375, 2017.
- TSUKASAKI, M. et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun.* v.9, n.701, 2018.
- VOLKOV, M. et al. Comment on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine.* v.10, n.433, 2018.
- WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases.* v.58, p.69 – 76, 2017.
- WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS neglected tropical diseases.* v.8, n.6, 2014.
- WEAVER, S.C. et al. *Chikungunya virus* and prospects for a vaccine. *Expert review of vaccines.* v. 11, n.9, 2012.
- WINNING, L., LINDEN, G. Periodontitis and systemic disease. *BDJ Team.* v.2, 2015.
- XAVIER, J. et al. Circulation of chikungunya virus East/Central/South African lineage in Rio de Janeiro, Brazil. *PLOS ONE.* v.14, n.6, 2019.
- YACTAYO, S. et al. Epidemiologia de Chikungunya nas Américas. *O Jornal de doenças infecciosas.* v. 214, 2016.
- YANG et al. Imbalance of Interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ Regulatory T-cell Dynamics in Rat Periapical Lesions. *Journal of Endodontics.* v.40, n.1, p.56 – 62, 2014.
- YUAN, H. et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology.* v.38, n.11, p.1029–1036, 2011.
- ZAID, A. et al. Review: Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. *Arthritis Rheumatol.* v.70, p.484-495, 2018.

ZELLER, H.; BORTEL, W.V.; SUDRE, B. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014, *The Journal of Infectious Diseases*. v.214, p.436–440, 2016.

OSCARSSON J, CLAEISSON R, LINDHOLM M, HÖGLUND ÅBERG C, JOHANSSON A. Tools of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to Evade the Host Response. *J Clin Med*. 22;8(7):1079, 2019.

Xavier J, Alcantara L, Fonseca V, et al. Increased interregional virus exchange and nucleotide diversity outline the expansion of the chikungunya virus ECSA lineage in Brazil. Preprint. *medRxiv*. 2023;2023.03.28.23287733. Published 2023 Apr 3. doi:10.1101/2023.03.28.23287733

Madeira MFM, Queiroz-Junior CM, Corrêa JD, et al. The role of 5-lipoxygenase in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced alveolar bone loss. *J Clin Periodontol*. 2017; 44: 793–802. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12755>

Poo YS, Nakaya H, Gardner J, et al. CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. *J Virol*. 2014;88(12):6862-6872. doi:10.1128/JVI.03364-13

Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol*. 2009;24(3):337-346. doi:10.14670/HH-24.337

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993 Nov;28(6 Pt 2):500-10. doi: 10.1111/j.1600-0765.1993.tb02113.x. PMID: 8263720.

Lam, J et al. “TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand.” *The Journal of clinical investigation* vol. 106,12 (2000): 1481-8. doi:10.1172/JCI11176

Brunetti, Giacomina et al. “LIGHT/TNFSF14 increases osteoclastogenesis and decreases osteoblastogenesis in multiple myeloma-bone disease.” *Oncotarget* vol. 5,24 (2014): 12950-67. doi:10.18632/oncotarget.2633

Tamada, K et al. “LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* vol. 164,8 (2000): 4105-10. doi:10.4049/jimmunol.164.8.4105

Abe, M., Kido, S., Hiasa, M. et al. BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1313–1315 (2006). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404228>

Hemingway, F., Taylor, R., Knowles, H. J., & Athanasou, N. A. (2011). *RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II*. *Bone*, 48(4), 938–944. doi:10.1016/j.bone.2010.12.023

Moreaux J, Cremer FW, Reme T, et al. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a

plasmablastic signature. *Blood*. 2005;106(3):1021-1030. doi:10.1182/blood-2004-11-4512

Wilson A. Silva, Dimas T. Covas, Rodrigo A. Panepucci, Rodrigo Proto-Siqueira, Jorge L.C. Siufi, Dalila L. Zanette, Anemari R.D. Santos, Marco A. Zago, The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells*, Volume 21, Issue 6, November 2003, Pages 661–669,

Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by A rankl-independent mechanism. *Bone* (2003) 32(1):1–7. doi: 10.1016/S8756-3282(02)00915-8

Giannoni, Paolo et al. “Chronic lymphocytic leukemia cells impair osteoblastogenesis and promote osteoclastogenesis: role of TNF α , IL-6 and IL-11 cytokines.” *Haematologica* vol. 106,10 2598-2612. 1 Oct. 2021, doi:10.3324/haematol.2019.231456

Bendre, M. S., Montague, D. C., Peery, T., Akel, N. S., Gaddy, D., & Suva, L. J. (2003). *Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease*. *Bone*, 33(1), 28–37. doi:10.1016/s8756-3282(03)00086-3

Liu, Xin et al. “Upregulation of interleukin-8 and activin A induces osteoclastogenesis in ameloblastoma.” *International journal of molecular medicine* vol. 43,6 (2019): 2329-2340. doi:10.3892/ijmm.2019.4171

Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw.* 2018 Feb;18(1):e8. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>

Kopesky, Paul et al. “Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis.” *Biology open* vol. 3,8 767-76. 25 Jul. 2014, doi:10.1242/bio.20148128

Taylor, Richard M et al. “VEGF, FLT3 ligand, PlGF and HGF can substitute for M-CSF to induce human osteoclast formation: implications for giant cell tumour pathobiology.” *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* vol. 92,10 (2012): 1398-406. doi:10.1038/labinvest.2012.108

Siddiqui YD, Nie X, Wang S, et al. Substance P aggravates ligature-induced periodontitis in mice. *Front Immunol.* 2023;14:1099017. Published 2023 Apr 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1099017

Bi R, Yang Y, Liao H, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces an inflammatory response via the cGAS-STING signaling pathway in a periodontitis mouse model. *Front Microbiol.* 2023;14:1183415. Published 2023 Jun 19. doi:10.3389/fmicb.2023.1183415

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1585-1591. doi:10.1902/jop.2008.080183

Munson, M A et al. "Molecular analysis of the microflora associated with dental caries." *Journal of clinical microbiology* vol. 42,7 (2004): 3023-9. doi:10.1128/JCM.42.7.3023-3029.2004

Cuesta, Alicia I et al. "Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients." *Acta odontologica latinoamericana : AOL* vol. 23,1 (2010): 20-6.

Loberto, J. C. S., Martins, C. A. de P., Santos, S. S. F. dos, Cortelli, J. R., & Jorge, A. O. C. (2004). *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2). doi:10.1590/s1517-83822004000100010

De Oliveira, David M P et al. "Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens." *Clinical microbiology reviews* vol. 33,3 e00181-19. 13 May. 2020, doi:10.1128/CMR.00181-19

Santos SSF, Loberto JCS, Martins CAP, Jorge AOC. Prevalência e sensibilidade *in vitro* de *Enterobacteriaceae* e *pseudomonas* isoladas da cavidade oral e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. *Braz Dental Sci*. 2002;5:74-83.

Zuanazzi, David et al. "Prevalence of potential bacterial respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalised individuals." *Archives of oral biology* vol. 55,1 (2010): 21-8. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.10.005

Crielaard, Wim et al. "Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health." *BMC medical genomics* vol. 4 22. 4 Mar. 2011, doi:10.1186/1755-8794-4-22

Golub LM, Payne JB, Reinhardt RA, Nieman G. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res*. 2006 Feb;85(2):102-5. doi: 10.1177/154405910608500201. PMID: 16434727.

Leech MT, Bartold PM. The association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015 Apr;29(2):189-201. doi: 10.1016/j.berh.2015.03.001. Epub 2015 May 1. PMID: 26362738.

Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Coelho FM, Costa VV, Bessoni RL, Sousa LF, Garlet GP, Souza Dda G, Teixeira MM, Silva TA. Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- α and the oral Microbiota. *J Immunol*. 2011 Oct 1;187(7):3821-30. doi: 10.4049/jimmunol.1101195. Epub 2011 Sep 2. PMID: 21890656.

Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(6):1187-1195. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207137

Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., ... Diamond, M. S. (2018). *Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses*. *Nature*, 557(7706), 570–574. doi:10.1038/s41586-018-0121-3
Youn-Kwan Jung, Seung-Woo Han, Gun-Woo Kim, Jae-Hwan Jeong, Hyun-Ju Kim, Je-Yong Choi, DICAM inhibits osteoclast differentiation through attenuation of the integrin α V β 3 pathway, *Journal of Bone and Mineral Research*, Volume 27, Issue 9, 1 September 2012, Pages 2024–2034, <https://doi.org/10.1002/jbmr.1632>

Kuo, T. Y., Hsieh, M. C., Cheng, C. D., Huang, R. Y., Van Dyke, T. E., Sung, C. E., Wang, C. Y., Hsieh, Y. S., & Cheng, W. C. (2023). Chlorhexidine gel topical application ameliorates inflammatory bone loss in experimental periodontitis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 122(9), 899–910. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2023.02.001>

Zhu, S., He, H., Gao, C., Luo, G., Xie, Y., Wang, H., Tian, L., Chen, X., Yu, X., & He, C. (2018). Ovariectomy-induced bone loss in TNF α and IL6 gene knockout mice is regulated by different mechanisms. *Journal of molecular endocrinology*, 60(3), 185–198. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0218>

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):30-44. doi: 10.1038/nri3785. PMID: 25534621; PMCID: PMC4276050.

Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis*. 2022 Sep;60(8-9):e23490. doi: 10.1002/dvg.23490. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35757898; PMCID: PMC9786271.

Wielento A, Lagosz-Cwik KB, Potempa J, Grabiec AM. The Role of Gingival Fibroblasts in the Pathogenesis of Periodontitis. *J Dent Res*. 2023 May;102(5):489-496. doi:

10.1177/00220345231151921. Epub 2023 Mar 8. PMID: 36883660; PMCID: PMC10249005.

Ghuman MS, Al-Masri M, Xavier G, Cobourne MT, McKay IJ, Hughes FJ. Gingival fibroblasts prevent BMP-mediated osteoblastic differentiation. *J Periodontal Res*. 2019 Jun;54(3):300–309. doi: 10.1111/jre.12631. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30511378; PMCID: PMC6492095.

Petersen, L. R., Stramer, S. L., & Powers, A. M. (2010). Chikungunya virus: possible impact on transfusion medicine. *Transfusion medicine reviews*, 24(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2009.09.002>

Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*. 2017 Mar 1;127(3):737–749. doi: 10.1172/JCI84417. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28248203; PMCID: PMC5330729.

Ning, X., Xia, B., Wang, J., Gao, R., & Ren, H. (2024). Host-adaptive mutations in Chikungunya virus genome. *Virulence*, 15(1), 2401985. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2401985>

Castillo-Macías, A.; et al. (2017). Immunology of viral infections with a high impact in Mexico: Dengue, Chikungunya, and Zika. *Medicina Universitaria*, 19(77), 198-207

Gasque, P., Couderc, T., Lecuit, M., Roques, P., & Ng, L. F. (2015). Chikungunya virus pathogenesis and immunity. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 15(4), 241–249. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1710>

Jensen, S., & Thomsen, A. R. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *Journal of virology*, 86(6), 2900–2910. <https://doi.org/10.1128/JVI.05738-11>

Nelemans, T., & Kikkert, M. (2019). Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections. *Viruses*, 11(10), 961. <https://doi.org/10.3390/v11100961>

Moreira TP, Sousa CDFD, Melo Costa VRD, et al. Tumour necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of Chikungunya virus infection. *Immunology*. 2023;168(3):444–458. doi: 10.1111/imm.13583

Schilte, C., Couderc, T., Chretien, F., Sourisseau, M., Gangneux, N., Guivel-Benhassine, F., Kraxner, A., Tschopp, J., Higgs, S., Michault, A., Arenzana-Seisdedos, F., Colonna, M., Peduto, L., Schwartz, O., Lecuit, M., & Albert, M. L. (2010). Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine*, 207(2), 429–442. <https://doi.org/10.1084/jem.20090851>

Yao Z, Ramachandran S, Huang S, Jami-Alahmadi Y, Wohlschlegel JA, Li MMH. Chikungunya virus glycoproteins transform macrophages into productive viral dissemination vessels. *bioRxiv* [Preprint]. 2023 May 29:2023.05.29.542714. doi: 10.1101/2023.05.29.542714. PMID: 37398144; PMCID: PMC10312455.

Webster B, Werneke SW, Zafirova B, This S, Coléon S, Décembre E, Paidassi H, Bouvier I, Joubert PE, Duffy D, Walzer T, Albert ML, Dreux M. Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections via IRF7-regulated interferon responses. *Elife*. 2018 Jun 19;7:e34273. doi: 10.7554/eLife.34273. PMID: 29914621; PMCID: PMC6008049.

Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Front Immunol*. 2016 Sep 19;7:366. doi: 10.3389/fimmu.2016.00366. PMID: 27698656; PMCID: PMC5027205.

Chirathaworn C, Chansaenroj J, Poovorawan Y. Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology. *Pathogens*. 2020 May 27;9(6):415. doi: 10.3390/pathogens9060415. PMID: 32471152; PMCID: PMC7350363.