DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS IMUNOGÊNICAS DA NEURAMINIDASE DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277: AVALIAÇÃO *IN SILICO* COM ALELOS HLA-DQ

Talita Lima Lula¹; Isaac Suzart Gomes Filho²; Ellen Karla Nobre dos Santos Lima³; Márcia Tosta Xavier⁴; Soraya Castro Trindade⁵.

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: talitalima.o@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isuzart@gmail.com

3. Participante do projeto, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: ellenobre@hotmail.com

4. Participante do projeto, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: tostamarcia@gmail.com

5. Co-orientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya.castrotrindade@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: periodontite; neuraminidase; *Porphyromonas gingivalis*.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa de caráter inflamatório, que acomete os tecidos de suporte do dente, podendo levar à reabsorção de osso alveolar, destruição de fibras colágenas e, por fim, perda dentária (LINDHE, 1999). O fator etiológico primário da periodontite constitui-se na presença de microrganismos patogênicos, como *Porphyromonas gingivalis*, no biofilme dentário (SOCRANSKY & HAFFAJJE, 2005).

P. gingivalis é um bacilo gram-negativo, anaeróbio estrito, imóvel, intensamente proteolítico e forma colônias marrons ou negras em ágar sangue. É um indutor de inflamação, reconhecido como um dos principais patógenos na periodontite crônica (MAYER et al., 2013).

Considerando que os patógenos desenvolvem mecanismos específicos de interação com seus hospedeiros (ALBERTS et al., 2010), o estudo de moléculas sintetizadas por *P. gingivalis* que contribuam para o desenvolvimento da doença periodontal (TEUGHEL et al., 2011) torna-se relevante. As neuraminidases são proteínas sintetizadas por microrganismos patogênicos, incluindo *P. gingivalis*, e são consideradas fatores de virulência, contribuindo para sua capacidade de induzir a doença periodontal (LI et al., 2012).

A maioria dos linfócitos T reconhece, como epítopos, peptídeos lineares curtos, pois seus receptores de antígenos (TCR) são específicos para antígenos apresentados por moléculas do MHC presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC) e tais moléculas se ligam a peptídeos. Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos provenientes de proteínas extracelulares, apresentados pelas moléculas MHC de classe II (ABBAS et al., 2011).

Nos seres humanos, os genes que codificam o MHC localizam-se no braço curto do cromossoma 6. O HLA (MHC humano) de classe II possui três loci de genes, denominados HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Cada locus contém vários genes separados denominados A ou B, que codificam as cadeias α ou β , respectivamente. A nomenclatura do alelo HLA considera o enorme polimorfismo (variação entre indivíduos) identificado por métodos sorológicos e moleculares (ABBAS et al., 2011).

As análises *in silico* são ferramentas atuais de compreensão de modelos biológicos sem as desvantagens inerentes à utilização de organismos vivos, como possibilidade de contaminação, custo, além das questões éticas. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou identificar *in silico* epítopos candidatos na sequência

proteica da neuraminidase de *P. gingivalis* ATCC33277, na indução da resposta imune; utilizando, para a análise, alelos HLA-DQ observados na população em estudo.

A identificação de epítomos peptídicos imunogênicos com afinidade para o HLA antecede a síntese das sequências peptídicas para utilização em experimentos com cultivo celular para a compreensão do papel das neuraminidasas na patogênese da periodontite crônica, bem como para a sua posterior utilização em ensaios imunoenzimáticos que auxiliem no diagnóstico da doença.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

A identificação de peptídeos com potencial imunogênico foi realizada por bioinformática, utilizando programa disponível online (YANG & YU, 2009), a exemplo do estudo realizado por Bittner-Eddy et al. (2013). A sequência da proteína Neuraminidase de *P. gingivalis* ATCC 33277 foi adquirida no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e analisada para a predição de peptídeos que se liguem a receptores MHCII humanos (HLA-DQ) e induzam uma resposta imune em cultura de células humanas. Para a predição, foi utilizada a ferramenta *MHC-II Binding Predictions* (<http://tools.immuneepitope.org/mhcii/>) do IEDB (*Immune Epitope Database*) (YANG & YU, 2009; VITA et al., 2010). Após a predição, os peptídeos com menor *rank* percentual foram selecionados para síntese química e para, posterior, avaliação *in vitro* da capacidade de induzir resposta em células T CD4⁺.

As sequências peptídicas obtidas foram analisadas para identificação da região proteica utilizando as anotações publicadas no *Protein Database* do NCBI (BAG34127). A ferramenta *Epitope Cluster Analysis* (<http://tools.iedb.org/cluster/>) foi utilizada para agrupar as sequências peptídicas e observar se havia semelhança entre elas. As sequências peptídicas foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados IEDB, buscando por similaridade por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

A predição resultou em 6 sequências peptídicas compostas por 15 resíduos de aminoácidos (15-mer). Dentre os peptídeos imunogênicos putativos obtidos, 3 estão no domínio BNR (*Bacterial Neuraminidase Repeat*). Desses, 1 peptídeo (N3) inclui sítio catalítico da enzima (QUADRO 1).

Não houve formação de grupos de sequências por similaridade (*Identity Threshold* 90%), confirmando serem sequências diferentes entre si. Não houve similaridade com as sequências depositadas no IEDB (*Exact Matches* / 100%), indicando o ineditismo das sequências obtidas.

A análise *in silico* possibilitou a seleção dos peptídeos preditos antes de serem sintetizados. Após a síntese química, os peptídeos imunogênicos integrarão estudos da resposta imune do hospedeiro diante do desafio por *P. gingivalis* na periodontite crônica.

Com este estudo, obteve-se peptídeos com potencial imunogênico que serão sintetizados e utilizados para determinar o perfil de resposta imune de indivíduos com periodontite crônica diante do fator de virulência estudado, favorecendo o entendimento da doença na busca do seu controle e diagnóstico por marcadores biológicos.

Proteína	Alelo HLA (Haplótipo)	Código	Peptídeo	Início	Fim	Protein Database (NCBI)*		
						Sialidase (182-517)	Domínio BNR** (204-500)	Sítio catalítico / ativo (Resíduo)#
Neuraminidase (526 aa)	DQA1*05:01/DQB1*03:01	N1	LMIFVG GVGLW QSTP	268	282	X	X	
	DQA1*05:01/DQB1*03:01	N2	RTTALS ADSVAG RCF	116	130			
	DQA1*05:01/DQB1*02:01	N3	DGTIGY FVEEDD EIS	496	510	X	X	504
	DQA1*05:01/DQB1*02:01	N4	SLVFIRF VLDDLF DA	510	524	X		
	DQA1*01:02/DQB1*06:02	N5	VVFCCL MAMMH LSGQ	17	31			
	DQA1*01:02/DQB1*06:02	N6	LKTANG TLIAMAD RR	199	213	X	X	

Quadro 1. Sequências peptídicas de Neuraminidase. Início e fim correspondem à posição na sequência proteica.

*Acesso Protein Database BAG34127.1

**Domínio BNR (*Bacterial Neuraminidase Repeat*)

#Resíduos 194, 219, 382, 398, 460, 488 e 504.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A predição de peptídeos imunogênicos por bioinformática é uma ferramenta útil para estudos de imunogenicidade do patógeno. A análise *in silico* detalhada possibilitou a seleção dos peptídeos que, após a síntese química, tornam-se promissores para aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade e apresentação do antígeno aos linfócitos T. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 109-38.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Patógenos, infecção e imunidade inata. In: *Biologia molecular da célula*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.1485-1538.

Bittner-Eddy PD, Fischer LA, Costalonga M. Identification of gingipain-specific I-Ab-restricted CD4+ T cells following mucosal colonization with *Porphyromonas gingivalis* in C57BL/6 mice. *Molecular oral microbiology* 2013; 28:452-66.

Li C, Kurniyati, Hu B, Bian J, Sun J, Zhang W, Liu J, Pan Y, Lia C. Abrogation of neuraminidase reduces biofilmformation, capsule biosynthesis, and virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 2012;80(1):3-13.

Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999.

Mayer MPA, Suguimoto ESA, Teixeira SRL. Microbiologia da doença periodontal. In: Spolidorio DMP, Duque C. Microbiologia e imunologia geral e odontológica. v.1. São Paulo: Artes Médicas, 2013. p.91-99.

Socransky SS, Haffajje AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000 2005; 38:135-87.

Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N. Microbiologia periodontal. In: Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza, periodontia clínica. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.p.251-94.

Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. The immune epitope database 2.0. Nucleic Acids Res. 2010;38(Databaseissue):D854-62.

Yang X, Yu X. An introduction to epitope prediction methods and software. Rev. Med. Virol. 2009;19(2):77-96.