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

Yuri Andrade de Oliveira¹; Isaac Suzart Gomes Filho²; Márcia Tosta Xavier³; Ellen Karla Nobre dos Santos Lima⁴; Ana Carla Montino Pimentel⁵; Thaise Passos Rocha⁶, Soraya Castro Trindade⁷

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: yuriandrade.odont@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isuzart@gmail.com
3. Participante do projeto, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: tostamarcia@gmail.com
4. Participante do projeto, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: ellenobre@hotmail.com
5. Participante do projeto, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, e-mail: anacpimentel_ba@hotmail.com
6. Participante do projeto, Graduanda em odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: thaisepassos@gmail.com
7. 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 inflamatória que acomete os tecidos de suporte do dente, podendo levar à reabsorção do osso alveolar, destruição de fibras colágenas e, por fim, perda dentária (Lindhe, 1999). Esta enfermidade apresenta etiologia multifatorial, tendo como um dos principais agentes etiológicos a presença de um biofilme disbiótico na região subgingival (Hajishengalis, 2014).

Dentre os microrganismos presentes no biofilme, destaca-se *Porphyromonas gingivalis*, que é um bacilo gram-negativo, anaeróbico estrito, imóvel, intensamente proteolítico e um importante indutor de inflamação (Mayer *et al.*, 2013). É um patógeno-chave na disbiose oral e é o microrganismo mais estudado em sua relação com a periodontite crônica (Hajishengallis & Lambris, 2012).

P. gingivalis possui uma ampla gama de fatores de virulência, como hemaglutininas (Gao *et al.*, 2010), LPS, fímbrias, polissacarídeo de superfície resistente ao complemento e proteases que degradam moléculas sinalizantes e citocinas (Preshaw & Taylor, 2011).

As neuraminidasas são proteínas sintetizadas por microrganismos patogênicos, incluindo *P. gingivalis*, e são consideradas fatores de virulência, contribuindo para a sua capacidade de induzir a doença periodontal (Teughels *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012).

Por outro lado, o reconhecimento desses fatores de virulência pelo sistema imune do hospedeiro ocorre por um sistema complexo de reconhecimento e sinalização da imunidade inata, culminando na apresentação de antígenos para os linfócitos T e ativação da imunidade inata. A maioria dos linfócitos T reconhece apenas 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 cromossomo 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).

Diante do exposto, o presente trabalho buscou identificar os epítomos peptídicos imunogênicos com afinidade para HLA, em seguida sintetizar as sequências peptídicas para depois utilizar em experimentos com cultivo celular para a compreensão do papel da neuraminidase na patogênese da periodontite crônica, bem como para posterior utilização em ensaios imunoenzimáticos que auxiliem no diagnóstico da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

A identificação de peptídeos com potencial imunogênico foi realizada por bioinformática, utilizando programas disponíveis 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*) - BAG34127.1 - e foi analisada para a predição de peptídeos que se liguem a receptores MHCII humanos (HLA-DR) e induzam uma resposta imune celular e humoral. 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 alta afinidade (menor *rank* percentual) foram selecionados para síntese química e avaliação *in vitro* da capacidade de induzir resposta em células T CD4⁺.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A predição resultou em 12 sequências peptídicas com 15 resíduos de aminoácidos (15-mer) (Quadro 1). Dentre os peptídeos imunogênicos putativos obtidos, 7 estão no domínio BNR (*Bacterial Neuraminidase Repeat*). Desses, 02 peptídeos incluem sítios catalíticos da enzima. 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.

Proteína	Alelo HLA	Código	Peptídeo	Início	Fim	Protein Database (NCBI)*		
						Sialidase (182-517)	Domínio BNR** (204-500)	Sítio catalítico / ativo (Resíduo) #
Neuraminidase (526 aa)	DRB3*01:01	N7	YSDMTL LADGTI GYF	488	502	X	X	488
	DRB3*01:01	N8	PDYKGR VSYDSFP IS	98	112			
	DRB4*01:01	N9	ALYLLV SDSLAV RDL	83	97			
	DRB4*01:01	N10	LMAMM HLSGQE VTMW	22	36			
	DRB5*01:01	N11	KQIRIGF SLPKETE E	65	79			
	DRB5*01:01	N12	KTANGT LIAMAD RRK	200	214	X	X	
	DRB1*13:02	N13	IPSILKT ANGTLI AM	195	209	X	X	
	DRB1*13:02	N14	VALVQT QAGKLL MIF	257	271	X	X	
	DRB1*15:01	N15	QAGKLL MIFVGG VGL	263	277	X	X	
	DRB1*15:01	N16	PASRRL YREYEA LFV	170	184	X		
	DRB1*07:01	N17	FGDVAL VQTQAG KLL	254	268	X	X	
	DRB1*07:01	N18	YRIPSIL KTANGT LI	193	207	X	X	194

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

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.
- BITTNER-EDDY, P.D.; FISCHER, L.A.; 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*, v. 28, p. 452-66, 2013.
- GAO, J.; NGUYEN, K.; HUNTER, N. Characterization of a hemophore-like protein from *Porphyromonas gingivalis*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 51, p. 40028-40038, 2010.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J.D. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *J. Immunobiology*, v. 217, p. 1111-1116, 2012.

HAJISHENGALLIS G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014; 35(1):3-11.

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

MAYER, M.P.A.; SUGUIMOTO, E.S.A.; TEIXEIRA, S.R.L. Microbiologia da doença periodontal. In: SPOLIDORIO, D.M.P.; DUQUE, C. *Microbiologia e imunologia geral e odontológica*. v.1. São Paulo: Artes Médicas, 2013. p. 91-99.

PRESHAW, P.M.; TAYLOR, J.J. Patogênese periodontal. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.; KLOKKEVOLD, P.R.; CARRANZA, F.A. *Carranza, periodontia clínica*. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 210-35.

TEUGHEL, W.; QUIRYNEN, M.; JAKUBOVICS, N. Microbiologia periodontal. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.; KLOKKEVOLD, P.R.; CARRANZA, F.A. *Carranza, periodontia clínica*. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 251-94.

VITA R, ZAREBSKI L, GREENBAUM JA, EMAMI H, HOOFF I, SALIMI N, DAMLE R, SETTE A, PETERS B. The immuneepitopedatabase 2.0. *NucleicAcids Res.* 2010;38(Databaseissue):D854-62.

YANG, X.; YU, X. An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev. Med. Virol.*, v. 19, n. 2, p. 77-96, 2009.