ESTUDO DOS NÍVEIS DE IGG ESPECÍFICA PARA O PEPTÍDEO K18 DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* ATCC33277 NA PERIODONTITE CRÔNICA.

Isis Carolina de Oliveira Cordeiro¹; Isaac Gomes Filho²; Ellen Karla Nobre dos Santos Lima³; Yuri Andrade de Oliveira⁴; Márcia Tosta Xavier⁵ e Soraya Castro Trindade⁶

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isiscarolinaoc@gmail.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, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: yuriandrade.odont@gmail.com
5. Participante do projeto, Curso de Odontologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: mtxavier@bahiana.edu.br
6. Coorientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya.castrotrindade@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: lys-gingipaína; peptídeo sintético; resposta imune.

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais acometem a população brasileira expressivamente (OPPERMANN *et al.*, 2015) e influenciam outras condições sistêmicas, como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares isquêmicas; diabetes mellitus; doenças pulmonares; nascimento prematuro e baixo peso ao nascimento (GOMES-FILHO *et al.*, 2007; 2010; CATON *et al.*, 2018).

Uma atenção especial deve ser dispensada à periodontite, uma doença inflamatória que acomete os tecidos de suporte do dente, podendo levar a reabsorção do osso alveolar, destruição de fibras colágenas e, por fim, a perda dentária (CATON, 2018). Apresenta etiologia multifatorial, tendo como um dos principais agentes etiológicos a presença de um biofilme disbiótico na região subgingival (MAYER *et al.*, 2013; HAJISHENGALLIS e LAMONT, 2014).

Dentre os microrganismos presentes no biofilme, destaca-se *Porphyromonas gingivalis*, bactéria intensamente proteolítica e indutora de inflamação (MAYER *et al.*, 2013). É um patógeno-chave na disbiose oral, sendo o microrganismo mais estudado em sua relação com a periodontite crônica (HAJISHENGALLIS, 2012; HAJISHENGALLIS e LAMONT, 2014).

P. gingivalis possui uma ampla gama de fatores de virulência, dentre eles, as proteases (gingipaínas) que degradam moléculas sinalizantes e citocinas (PRESHAW & TAYLOR, 2011), contribuindo para a sua capacidade de induzir doença periodontal (TEUGHELIS *et al.*, 2011). Atualmente, são descritas, para *P. gingivalis* ATCC 33277, as Arg-gingipaínas (RgpA e RgpB) e a Lys-gingipaína (Kgp), que teve um dos seus peptídeos, K18, obtidos por ferramenta de imunoinformática, investigado no presente estudo.

Diante da importância da compreensão da interação microrganismo-hospedeiro na patogênese da periodontite, o presente trabalho pretende avaliar o reconhecimento do peptídeo K18 de lys-gingipaína de *P. gingivalis* ATCC33277 por IgG de indivíduos com e sem periodontite.

MÉTODO

A presente investigação está vinculada ao projeto “Análise *in silico* e *in vitro* de epítomos candidatos de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277”. O peptídeo K18 foi obtido a partir de análise *in silico* realizada no referido projeto, que objetivou identificar, por bioinformática, peptídeos com potencial imunogênico em proteínas de *P. gingivalis* e, após a síntese química, testar *in vitro* tais peptídeos quanto a sua imunorreatividade e imunogenicidade.

A síntese do peptídeo K18 foi feita pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda (Diadema - SP). A solubilização do peptídeo liofilizado foi realizada em tampão de trabalho carbonato-bicarbonato e as alíquotas foram armazenadas a -20°C.

Para as análises de imunogenicidade, foi empregado um *pool* de soros de indivíduos com periodontite (controle positivo) e um *pool* de soros de indivíduos sem periodontite (controle negativo). Foram selecionados 21 indivíduos com periodontite e 21 indivíduos sem a doença, todos com idade igual ou superior a 18 anos, que buscaram atendimento no ambulatório da disciplina Estudos Integrados IX do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (Feira de Santana - BA). Os critérios avaliados pela anamnese para a não inclusão dos voluntários foram número de dentes inferior a 10; história de doenças sistêmicas; gestação atual; tratamento periodontal anterior (1 ano); tabagismo atual ou anterior; etilismo atual ou anterior; uso de antibióticos e anti-inflamatórios, respectivamente, nos seis e dois meses anteriores à coleta. Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido em duas vias. O diagnóstico periodontal foi realizado com base nos critérios preconizados por GOMES-FILHO et al. (2007).

O soro dos participantes foi obtido após coleta de sangue por punção venosa na fossa antecubital em tubos para coleta a vácuo (BD, SP, Brasil) com ativador de coagulação. Os soros foram testados quanto à sua imunorreatividade ao extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis* (TRINDADE et al., 2008).

Para a composição dos *pools*, os indivíduos foram selecionados de acordo com o diagnóstico periodontal e com a reatividade do soro. Assim, o *pool* controle positivo foi composto pelo soro de seis indivíduos com diagnóstico de periodontite e com os maiores valores de densidade ótica obtidos nos ensaios com o extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis*. O *pool* controle negativo foi composto pelo soro de cinco indivíduos sem a referida doença e com os menores valores de densidade ótica obtidos nos ensaios com o extrato sonicado de *Porphyromonas gingivalis*.

A imunorreatividade dos *pools* ao peptídeo K18 foi testada por ensaio imunoenzimático, padronizando-se as concentrações de antígeno, anticorpo de detecção conjugado com peroxidase e a diluição dos *pools* de soro (ELISA *checkboard*). A concentração de IgG foi mensurada por leitura da densidade ótica (D.O.) em leitor de ELISA padrão, com

Os valores de densidade ótica obtidos com os *pools* controle positivo foram divididos pelos valores do *pool* controle negativo (Média Grupo PC/Média Grupo SP), para a obtenção de um coeficiente que determina a melhor diferenciação de resposta entre os grupos.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Os soros testados apresentaram imunorreatividade ao peptídeo K18, com o reconhecimento deste peptídeo por IgG específica. Das condições de estudo testadas no imunoensaio enzimático (ELISA), a utilização do K18 com os *pools* de soro diluídos a 1:100 apresentou a melhor condição de diferenciação entre o *pool* de soros de indivíduos com periodontite (controle positivo) e o *pool* de soros de indivíduos sem a

doença (controle negativo), com um coeficiente (DO controle positivo/ Do controle negativo) de 1.8 (Gráfico 01). Este dado indica que o reconhecimento de K18 por IgG no controle positivo foi 80% maior (em densidade ótica) que no controle negativo.

Os valores de coeficiente observados nos experimentos com o extrato sonificado de *Porphyromonas gingivalis* foram iguais (soro 1:250) ou inferiores (soro 1:100) aos encontrados com o K18, possivelmente pela grande variedade de antígenos existente no extrato, favorecendo a ocorrência de reatividade cruzada, principalmente no *pool* controle negativo (Franca et al., 2007; Trindade et al., 2008). A utilização de proteínas/peptídeos isolados, que apresentem um bom potencial de imunoreatividade, parece ser mais adequado para o emprego em imunoenaios que visem o conhecimento da resposta imune humoral (Trindade et al., 2012).

Diante do exposto, o emprego do peptídeo K18 se mostrou promissor para análises de imunoreatividade futuras. Para isto, são necessários ensaios com a utilização de amostras individuais de soro, utilizando grupos de indivíduos com e sem periodontite com tamanho de amostra suficiente para a comparação estatística entre eles. Sabendo-se que os fatores de virulência podem induzir a produção de citocinas pró e antiinflamatórias, considera-se que estudar tais moléculas seja importante na compreensão dos mecanismos patogênicos da periodontite. Logo, a análise *in silico* possibilita que peptídeos promissores na aplicação biotecnológica sejam identificados, assim como sua interação com o hospedeiro (BITTNER-EDDY et al., 2013). A utilização da análise *in silico* junto com ferramentas de imunodiagnósticos, como por exemplo a avaliação do reconhecimento de peptídeos sintéticos obtidos a partir da análise *in silico* por IgG humana específica, pode auxiliar no estudo dos fatores de virulência e na busca pelo entendimento da patogenicidade de *P. gingivalis*.

A realização de estudos que fortaleçam o entendimento da interação patógeno-hospedeiro é de grande relevância na periodontite, uma doença inflamatória que pode levar a diversos agravos na saúde do indivíduo (CATON et al., 2018), cuja relação com estes agravos pode ter a sua plausibilidade biológica pautada na referida interação patógeno-hospedeiro.

Gráfico 01: Coeficiente entre as médias da D.O. obtidas para cada grupo (Média Grupo PC/Média Grupo SP) após análise da reatividade à IgG do peptídeo K18. Este foi reconhecido por IgG específica presente no soro dos participantes.

CONCLUSÃO

O peptídeo K18 possui potencial imunogênico e foi selecionado para sua utilização em estudos *in vitro* subsequentes.

REFERÊNCIAS

- BITTNER-EDDY, P.D.; FISCHER, L.A.; COSTALONGA, M. Identification of gingipain-specific I-A^b-restricted CD4⁺ T cells following mucosal colonization with *Porphyromonas gingivalis* in C57BL/6 mice. *Molecular oral microbiology*, v. 28, p. 452-66, 2013.
- CATON, J.G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I.L.C.; JEPSEN, S.; KORNMAN, K.S. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018;45(Suppl 20): S1-S8.
- Franca M, Moura-Costa L, Meyer RJ, Trindade SC, Tunes UR, Freire SM. Humoral immune response to antigens of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci* 2007;15(3):213-9.
- GOMES-FILHO, I.S.; CRUZ, S.S.; REZENDE, E.J.; DOS SANTOS, C.A.; SOLEDADE, K.R.; MAGALHÃES, M.A.; DE AZEVEDO, A.C.; TRINDADE, S.C.; VIANNA, M.I.; PASSOS, J.S.; CERQUEIRA, E.M. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity / low birth weight. *J Clin Periodontol.*, v. 34, n. 11, p. 957-63, 2007.
- GOMES-FILHO, I.S.; CRUZ, S.S.; COSTA, M.C.N.; PASSOS, J.S.; CERQUEIRA, E.M.M.; SAMPAIO, F.P.; PEREIRA, E.C.; MIRANDA, L.F. Periodontal therapy and low birth weight: preliminary results from an alternative methodologic strategy. *Journal of Periodontology*, v. 81, n. 12, p. 1725-33, 2010.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J.D. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *J. Immunobiology*, v. 217, p. 1111-1116, 2012.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Immunology*, v.44, p. 328-338, 2014.
- 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.
- OPPERMANN, R.V; HAAS, A. N; RÖSING, C. K; SUSIN, C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *J. Periodontology* 2000. 2015; 67:13–33.
- 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.
- Trindade SC, Gomes-Filho IS, Meyer RJ, Vale VC, Pugliese L, Freire SM. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. *Journal of the international academy of Periodontology* 2008;10(2):50-8.
- Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EMM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1b, IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodont Res* 2012;47:27-32.