

ESTUDO DOS NÍVEIS DE IgG ESPECÍFICA PARA O PEPTÍDEO K17 DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 NA PERIODONTITE CRÔNICA

Yuri Andrade de Oliveira¹; Isaac Suzart Gomes Filho²; Soraya Castro Trindade³; Ellen Karla Nobre dos Santos Lima⁴; Márcia Tosta Xavier⁵

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. Coorientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya.castrotrindade@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, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: tostamarcia@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Lys-gingipaína; peptídeo sintético; resposta imune

INTRODUÇÃO

A periodontite crônica é uma inflamação progressiva do periodonto, caracterizada clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem, perda de inserção periodontal e do osso alveolar e por bolsa periodontal (CATON *et al.*, 2018). Sua etiologia está relacionada à exacerbação da resposta imune inata e adaptativa diante da presença de um biofilme subgengival sinérgico e disbiótico. Dentre os microrganismos estudados, destaca-se *Porphyromonas gingivalis*, considerado patógeno-chave na disbiose oral (HAJISHENGALIS & LAMONT, 2014). Em sua interação com o sistema imune do hospedeiro, *P. gingivalis* apresenta fatores de virulência, tais como as gingipaínas, suas principais proteases (GUO, NGUYEN & POTEPA, 2010).

As gingipaínas apresentam capacidade de adesão, degradação tecidual e evasão das respostas do hospedeiro. São moléculas que promovem aumento da permeabilidade vascular através da liberação de bradicinina, o que contribui para a produção de fluido gengival e formação de edema nos sítios periodontais infectados, suprimindo a nutrição bacteriana (IMAMURA, 2003). Elas estão envolvidas, especialmente a Lys-gingipaína (Kgp), na degradação de junções de adesão das células epiteliais, o que pode contribuir para a invasão de tecido conjuntivo periodontal por *P. gingivalis* (KATZ *et al.*, 2002).

Identificar e analisar peptídeos com atividade imunogênica em Kgp pode contribuir para a compreensão da influência do microrganismo na etiologia da doença periodontal, bem como para o entendimento dos mecanismos de resposta do hospedeiro à infecção.

A predição de peptídeos imunogênicos por bioinformática tem sido uma ferramenta útil para estudos de imunogenicidade do patógeno (BITTNER-EDDY *et al.*, 2013). Tal análise *in silico* possibilita a identificação na sequência proteica dos peptídeos com potencial

imunogênico, os quais, após a síntese química, tornam-se promissores para aplicação biotecnológica.

Assim, peptídeos sintéticos de Kgp, obtidos a partir da análise *in silico* da sua sequência de aminoácidos, capazes de ser reconhecidos por IgG humana específica, podem auxiliar no estudo deste fator de virulência e na busca pelo entendimento da patogenicidade de *P. gingivalis*.

Diante do exposto e por ser a periodontite uma doença de alta prevalência na população mundial (OPPERMANN *et al.*, 2015), que pode levar a diversos agravos na saúde do indivíduo (DYKE & WINKELHOFF, 2013; CATON *et al.*, 2018), torna-se necessário o estudo dos mecanismos de interação entre o patógeno e o hospedeiro, para o melhor conhecimento da patogênese da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do sangue periférico e obtenção das amostras de soro

O sangue dos participantes da pesquisa foi coletado por punção venosa na fossa antecubital, seguindo as recomendações publicadas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (2009).

Foram utilizados tubos para coleta a vácuo (BD, SP, Brasil), obtendo-se 5 mL de sangue em tubo com ativador de coagulação, a partir do qual foi obtido o soro após centrifugação por 10 minutos. O soro foi conservado a -20°C.

2. Diluição do peptídeo

O peptídeo K17 foi sintetizado pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento Ltda (Diadema - SP). A solubilização do peptídeo liofilizado foi realizada em tampão de trabalho carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH = 9,6) e as alíquotas foram armazenadas a -20°C.

3. Teste de imunorreatividade

O ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) foi utilizado para avaliar a imunorreatividade do peptídeo sintético K17 ao anticorpo IgG humano, através da mensuração indireta dos níveis de IgG no soro dos participantes. O extrato bruto sonificado de *P. gingivalis* foi utilizado como padrão.

O soro foi aplicado em poços da placa de microtitulação contendo o antígeno (peptídeo K17) aderido. Após lavagem da placa, o anticorpo anti-IgG humano conjugado a uma peroxidase foi aplicado. Após lavagem, a presença de peroxidase ligada ao complexo foi observada mediante a adição do substrato cromogênico (H₂O₂-OPD). A concentração de IgG foi mensurada por leitura da densidade ótica (D.O.) em leitor de ELISA padrão.

4. Análise estatística

Após observar a imunorreatividade, a análise estatística foi utilizada para verificar a diferença dos níveis de IgG entre o grupo com periodontite crônica e grupo sem periodontite. Foi obtido um quociente entre as médias da D.O. obtidas para cada grupo (Média Grupo PC/Média Grupo SP). Quanto maior o quociente obtido, maior a diferença do nível de IgG entre os grupos. O programa SPSS foi utilizado para gerenciar o banco de dados e para a análise dos valores de D.O.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunorreatividade do peptídeo sintético K17 foi observada nos dois grupos e a diferença entre os grupos foi de 1,6 na concentração de soro 1:100 (Gráfico 01); tendo assim uma produção de IgG contra K17 60% mais elevada nos indivíduos portadores de periodontite crônica avaliados.

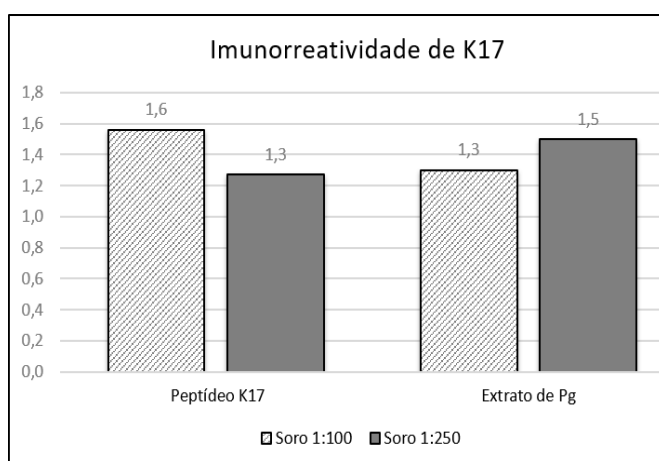


Gráfico 01: Coeficiente entre as médias dos níveis de IgG anti-K17 obtidas para cada grupo (Média Grupo PC/Média Grupo SP). Brasil, 2018
O peptídeo K17 foi reconhecido por IgG específica presente no soro dos participantes. O extrato bruto sonicado de *P. gingivalis* foi utilizado para comparação.

O coeficiente encontrado nos imunoenaios feitos com K17 e soro 1:100 (1,6) foi ligeiramente maior do que aquele encontrado com o extrato de Pg e soro a 1:250 (1,5). K17 se mostrou capaz de induzir uma resposta de IgG nos indivíduos com periodontite 60% maior que nos indivíduos sem a doença. Esta taxa cai para 50% quando foi utilizado o extrato bruto de *Porphyromonas gingivalis*, antígeno cuja indução de IgG já vem sendo demonstrada na literatura (TRINDADE *et al.*, 2008; FRANCA *et al.*, 2007).

O extrato bacteriano dispõe de uma variedade de antígenos com potencial de ligação à IgG, ofertando aumento substancial nas leituras de ELISA também nos indivíduos sem periodontite, muito provavelmente em razão de uma maior chance da ocorrência de reação

cruzada, o que é minimizado quando proteínas ou peptídeos isolados são empregados no teste (TRINDADE *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2012).

Para confirmar estes resultados, ensaios utilizando amostras isoladas para a avaliação da resposta imune humoral, bem como testes com cultivo celular (empregando K17) deverão ser realizados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O peptídeo K17 possui potencial imunogênico e foi selecionado para utilização em estudos *in vitro* subsequentes.

REFERÊNCIAS

- 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* 2013;28:452-66.
- 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.
- DYKE, T. E. V; WINKELHOFF, A.J.V. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol* 2013; 40 (sup 14): S1-7
- GUO, Y.; NGUYEN, K.-A.; POTEPA, J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontology* 2000. 2010; 54:15-44.
- HAJISHENGALLIS, G., LAMONT, R.J. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol*. 2014; 44:328-38.
- IMAMURA, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol*. 2003;74(1):111-8.
- KATZ, J.; YANG, Q.-B.; ZHANG, P.; POTEPA, J.; TRAVIS, J.; MICHALEK, S.M.; BALKOVETZ, D.F. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infection and Immunity* 2002;70(5):2512-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.