

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA “ALBERTO CAZORLA TALLERI”**



**Predicción *in silico* de dianas de cistein proteasas de *Porphyromonas gingivalis* y serín proteasas de *Treponema denticola* en el tejido nervioso.**

**Trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller en Ciencias con mención en Biología**

**AUTORAS**

Piamonte Flores, Alessia Lucila

Vise López, Vilma Alejandra

**ASESORA**

PhD. MSc. Machicado Rivero, Claudia Inés

**Lima, Perú**

**2022**

## Tabla de contenidos

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>ESTADO DEL ARTE</b> .....	3
1. Enfermedad de Alzheimer (EA) como consecuencia de una digestión aberrante por proteasas .....	3
1.1. Digestión por proteasas y defectos vinculados a patología nerviosas .....	3
1.2. Patogénesis de EA .....	3
1.2.1. Alteraciones en la digestión del péptido $\beta$ amiloide ( $A\beta$ ) y proteína Tau .....	4
2. Relación entre la enfermedad de Alzheimer y Periodontitis Crónica .....	4
2.1. Microbioma oral .....	4
2.2. La Periodontitis Crónica (PC) .....	4
2.3. Asociación entre la PC y la EA .....	5
2.3.1. <i>P. gingivalis</i> y factores de virulencia .....	5
2.3.2. Potenciales mecanismos provocados por <i>P. gingivalis</i> .....	6
2.3.3. Presencia de <i>T. denticola</i> en tejido cerebral <i>post mortem</i> .....	6
2.3.4. Evidencia de la acción de <i>T. denticola</i> en la EA .....	6
3. Proteasas de <i>T. denticola</i> y <i>P. gingivalis</i> .....	7
3.1. Proteasas de <i>T. denticola</i> .....	7
3.1.1. Dentilisina .....	7
3.1.2. Hemolisina .....	7
3.1.3. Dentipaína .....	7
3.2. Proteasas de <i>P. gingivalis</i> .....	8
3.2.1. Gingipaínas .....	8
<b>PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	9
<b>ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	11
<b>REFERENCIAS</b> .....	12
<b>ANEXOS</b> .....	15

## Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de agregados neurotóxicos, resultantes de la escisión de proteínas precursoras por proteasas, y que son responsables de la neurodegeneración y muerte neuronal [1]. En la enfermedad de Alzheimer, los agregados neurotóxicos son formados por la acumulación de péptidos A $\beta$  y proteínas Tau hiperfosforiladas, denominados placas seniles y ovillos neurofibrilares, respectivamente. Dichos agregados pueden ser inducidos experimentalmente en ratones por dos bacterias de la microbiota oral, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* [2][3][4]. Ambas bacterias causan la periodontitis crónica, una condición que surge por disbiosis oral y se ha asociado como factor de riesgo de Alzheimer [5]. Tanto *P. gingivalis* como *T. denticola* son capaces de ingresar al torrente sanguíneo y diseminarse a diferentes partes del organismo [5]. De hecho, ambas bacterias se han encontrado en el tejido cerebral de pacientes con la enfermedad de Alzheimer e incluso, se ha encontrado que las cistein proteasas de *P. gingivalis*, conocidas como gingipainas, pueden escindir a la proteína Tau en fragmentos neurotóxicos que son propensos a agruparse [2][6]. El tejido nervioso parece tener dianas de las gingipainas como ha sugerido un reciente estudio, donde un grupo de proteínas sobreexpresadas en tejido nervioso infectado por *P. gingivalis* fue predicho como polipéptidos susceptibles al corte por gingipainas. Sin embargo, la metodología fue débil pues no siguió un análisis riguroso basado en secuencia ni predijo el sitio exacto de corte [7]. En el caso de *T. denticola*, no se conoce cómo induce a la agregación de péptidos neurotóxicos, pero es posible que esté mediado por digestión a cargo de proteasas. Por ello, en este estudio proponemos la búsqueda *in silico* de dianas de cistein proteasas (incluida la gingipaina) de *P. gingivalis* y *serín* proteasas de *T. denticola*, explorando el proteoma del tejido nervioso afectado en la enfermedad de Alzheimer. La existencia de proteínas, en el cerebro, digeribles por proteasas de bacterias causantes de periodontitis crónica, sería una evidencia adicional del posible rol de dichas bacterias en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

**Palabras clave:** Alzheimer, proteasas, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *in silico*

## Abstract

Neurodegenerative diseases are characterized by neurotoxic fragments, which are a result of the cleavage of precursor proteins by proteases, and which are responsible for neurodegeneration and neuronal death [1]. In Alzheimer disease, the neurotoxic fragments are formed by the accumulation of A $\beta$  peptides and hyperphosphorylated Tau proteins, called senile plaques and neurofibrillary tangles, respectively. These aggregates can be induced in mice experiments by two bacteria of the oral microbiota, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* [2][3][4]. Both bacterias cause chronic periodontitis, a condition that arises from oral dysbiosis and has been associated as a risk factor for Alzheimer's [5]. Both *P. gingivalis* and *T. denticola* are able to enter the bloodstream and spread to different parts of the body [5]. In fact, both bacteria have been found in the brain tissue of patients with Alzheimer's disease, and it has even been found that *P. gingivalis* cysteine proteases, known as gingipains, can cleave Tau protein into neurotoxic fragments that are prone to clumping [2][6]. Nervous tissue seems to have targets of gingipains as suggested by a recent study, where a group of proteins overexpressed in nervous tissue infected by *P. gingivalis* was predicted as polypeptides susceptible to cleavage by gingipains. However, the methodology was weak as it did not follow a rigorous sequence-based analysis or predict the exact cleavage site [7]. In the case of *T. denticola*, it is not known how it induces the aggregation of neurotoxic peptides, but it is possible that it is mediated by digestion by proteases. Therefore, in this study we propose the *in silico* search for targets of cysteine proteases (including gingipain) from *P. gingivalis* and serine proteases from *T. denticola*, exploring the proteome of the nervous tissue affected in Alzheimer's disease. The existence of proteins, in the brain, digestible by proteases of bacteria that cause chronic periodontitis, would be additional evidence of the possible role of these bacteria in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer, proteases, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *in silico*.

## **1. Estado del Arte**

### **I. Enfermedad de Alzheimer (EA) como consecuencia de una digestión aberrante por proteasas**

#### **1.1. Digestión por proteasas y defectos vinculados a patología nerviosas**

La digestión por proteasas es un proceso biológico dirigido a degradar proteínas y a reciclar sus componentes individuales, los aminoácidos. La proteólisis por proteasas es importante para mantener la homeostasis intracelular, así como para garantizar la maduración de ciertas proteínas y destruir polipéptidos disfuncionales o mal plegados. En ocasiones, sin embargo, la digestión por proteasas no ocurre con normalidad, desencadenando una serie de efectos que incluyen la acumulación de proteínas defectuosas [8].

La función del sistema nervioso depende de la formación de péptidos o neuropéptidos, la resulta de la proteólisis de proteínas precursoras, acción realizada por proteasas intracelulares. El tamaño de los (neuro)péptidos, que pueden actuar como neurotransmisores, varía entre los 3 a 40 aminoácidos, y dependiendo de su secuencia, tienen diferentes acciones fisiológicas como la regulación del comportamiento, la cognición, la analgesia, entre otros [8].

En algunos casos, los neuropéptidos se pliegan de forma incorrecta y posteriormente se generan agregados neurotóxicos. Estos últimos, al no ser reconocidos y digeridos por los diferentes sistemas de degradación, persisten en su forma disfuncional, recibiendo el nombre de agregados neurotóxicos. Estos últimos provocan daño en distintas estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC), contribuyendo así al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre otras [1].

En el SNC, los agregados neurotóxicos tienden a acumularse con facilidad, especialmente en personas de edad avanzada, debido a que la característica de no división de las neuronas aumenta la probabilidad de acumulación [1].

#### **1.2. Patogénesis de EA**

La EA se caracteriza por la neuroinflamación, la cual surge como consecuencia de los agregados extracelulares de A $\beta$ , denominados placas seniles, y agregados intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada, conocidos como ovillos neurofibrilares (NFT) [9]. Estas placas de A $\beta$  se desarrollan inicialmente en las regiones de la neocorteza basal, temporal y orbitofrontal del cerebro y en etapas posteriores progresan a lo largo de la neocorteza, el hipocampo, la amígdala, el diencefalo y los ganglios basales [9].

### **1.2.1. Alteraciones en la digestión del péptido $\beta$ amiloide ( $A\beta$ ) y proteína Tau**

Las placas seniles están conformadas por los péptidos  $A\beta$  de diferente longitud, los cuales derivan de la proteólisis del precursor amiloide (APP) [10]. Este precursor es escindido primero por una enzima  $\beta$ -secretasa (BACE1 o una catepsina  $\beta$ ) y luego por una  $\gamma$ -secretasa, resultando en péptidos  $A\beta$  cortos y benignos [11]. Sin embargo, existen ocasiones en la que  $\gamma$ -secretasa realiza cortes ineficientes en el extremo C-terminal del péptido  $A\beta$ , ocasionando péptidos más propensos a agregarse y con actividad neurotóxica, como son el  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  [11].

Asimismo, a través de la acción de caspasas, la proteína Tau puede sufrir de proteólisis en sus extremos C- y N-terminal [10]. Resulta que una vez escindida, es mucho más fácil de fosforilarse para luego formar los ovillos neurofibrilares; sin embargo, la proteólisis no parece ser necesaria para el desarrollo de estos ovillos, pero es una vía más fácil [10].

## **II. Relación entre la enfermedad de Alzheimer y Periodontitis Crónica**

### **2.1. Microbioma oral**

El microbioma oral está compuesto por unas 770 especies de microorganismos, los cuales tienden a formar biofilms sobre la superficie de los dientes [12][13]. Unas 700 especies bacterianas conforman el microbioma oral, las cuales conviven con archae, hongos, virus y protozoarios. Las especies de Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria son algunas de las más comunes en la cavidad oral. El microbioma oral contiene un grupo de microorganismos que son comunes a todos los humanos, mientras que otro grupo son variables entre individuos y fluctuante con el estilo de vida [14].

Diferentes factores tales como la dieta, edad, flujo salival, consumo de medicamentos y hábitos de limpieza bucal pueden alterar la composición del microbioma oral [12]. Así, por ejemplo, una óptima limpieza bucal conlleva a una mayor presencia de bacterias Gram positivas, caso contrario encontramos una mayor cantidad de bacterias Gram negativas [13]. La alteración de la composición del microbioma oral normal se denomina disbiosis, la cual favorece el desarrollo de patologías orales como la periodontitis [13].

### **2.2. La Periodontitis Crónica (PC)**

La PC es una enfermedad inflamatoria frecuente que afecta al tejido de soporte de los dientes [13]. Inicialmente se caracteriza por la inflamación de las encías, denominada gingivitis, más tarde, si no es tratada, evoluciona a periodontitis [15]. La PC se origina por aumento en la proporción de bacterias Gram negativas en la cavidad oral, las cuales liberan factores proinflamatorios al torrente sanguíneo

[13]. Entre las bacterias causantes de la PC destacan *P. gingivalis*, *T. denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Selenomonas spp*, entre otras [5]. Estas son capaces de invadir la cavidad oral, atravesar el epitelio de la bolsa periodontal e ingresar al torrente sanguíneo, ocasionando un cuadro de inflamación sistémica [5].

La PC puede afectar otros órganos y tejidos distantes y ha sido asociada con el desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus, trastornos articulares autoinmunes, enfermedades cardiovasculares inflamatorias y la EA [15].

### **2.3. Asociación entre la PC y la EA**

La EA se caracteriza por la neuroinflamación, formación de placas seniles y de ovillos neurofibrilares. Se ha visto que la PC puede desencadenar la neuroinflamación a través de la inflamación sistémica [16]. Las citoquinas periféricas resultantes de la PC afectan la estabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo el paso de citocinas proinflamatorias y microorganismos al SNC [16]. Las citoquinas también pueden llegar al SNC a través de los nervios trigéminos [16]. Todo ello desencadena la activación de las microglías, que conduce a un aumento en la formación de placas seniles y de ovillos neurofibrilares, los cuales causan la neurodegeneración [16]. Este mecanismo a través de citoquinas promotoras de la neuroinflamación no sería el único detrás de la asociación de la PC y la EA.

Algunos estudios han reportado la presencia de microorganismos causantes de la PC en el tejido nervioso de pacientes con EA. Por ejemplo, se encontró un aumento significativo de TNF- $\alpha$  y anticuerpos contra *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con la EA, en comparación con los sujetos sanos [17]. Años después, se confirmó la presencia de *P. gingivalis* y *T. denticola* en el tejido nervioso de pacientes con la EA, mediante la técnica molecular de PCR [18][2]. Estos hallazgos sugieren que las bacterias causantes de la PC podrían trasladarse y habitar al tejido nervioso, pudiendo así tener un papel en la fisiopatología de la EA.

#### **2.3.1. *P. gingivalis* y factores de virulencia**

*P. gingivalis* es una bacteria gram negativa capaz de atravesar la membrana hematoencefálica y llegar al cerebro, donde puede permanecer por mucho tiempo [19]. Entre sus factores de virulencia están las gingipaínas, los lipopolisacáridos (LPS) y la dihidroceramida de fosfoglicerol (PGDHC). De estos, los dos primeros factores han sido encontrados en cerebros de pacientes con EA [19].

En el caso de las gingipaínas, estas son cisteín proteasas secretadas por *P. gingivalis*, que se encuentran contenidas en vesículas de la membrana externa (OMV) y que se dividen en tres tipos: lisina-gingipaína (Kgp), arginina-gingipaína A (RgpA) y arginina-gingipaína B (RgpB) [2]. Las Kgp

se encontraron en la corteza cerebral de pacientes con la EA, mientras que las RpgB estaban colocalizadas con los ovillos neurofibrilares y placas seniles [2]. Asimismo, la presencia de gingipaínas en ratones indujo la formación de péptidos A $\beta$ 1–42, los cuales son péptidos antimicrobianos que pueden agregarse en placas seniles neurotóxicas [2]. También, se descubrió que las gingipaínas Kpg y RgpB eran capaces de escindir la proteína Tau en fragmentos propensos a agruparse [2].

La función de los LPS en la EA aún no se ha profundizado en pacientes humanos; sin embargo, se sabe que en modelos de ratones activan la neuroinflamación [19]. En el caso del lípido PGDHC, se encontró que es capaz de aumentar la presencia de A $\beta$ 1–42 de en cultivo de neuronas de hámster y la fosforilación de la proteína Tau en cultivo de neuronas humanas [20].

### **2.3.2. Potenciales mecanismos provocados por *P. gingivalis***

El mecanismo de acción de *P. gingivalis* en pacientes con la EA aún es incierto; sin embargo, existen algunas hipótesis sobre ello. Según Dominy et al, una vez que *P. gingivalis* ingresa al cerebro, ya sea por la barrera hematoencefálica o por los nervios trigéminos, se propaga lentamente de neurona a neurona tal como ocurre en la transmisión vascular de célula a célula [2].

La otra hipótesis sostenida por Seymour y colaboradores menciona que la bacteria no llega al cerebro sino sus OMVs, las cuales se localizan en ciertas zonas del cerebro y liberan su contenido desencadenando neuroinflamación y activando a las microglías [19]. Esto último provocaría un aumento de la neuroinflamación y de la actividad de los factores de virulencia de la bacteria, ocasionando un deterioro cognitivo agresivo [19].

### **2.3.3. Presencia de *T. denticola* en tejido cerebral *post mortem***

*T. denticola* es una bacteria Gram negativa que también está relacionada con la PC, presentando ciertos factores de virulencia que agravan dicha infección. Se ha investigado la presencia de este microorganismo en cerebros de pacientes con EA, tal como se hizo con *P. gingivalis*. La presencia de *T. denticola* en el cerebro, analizado por inmunohistoquímica, no reveló rastros de dicha bacteria [21]. Sin embargo, mediante PCR, una prueba molecular altamente específica y sensible, se determinó una mayor presencia de *T. denticola* en cerebros de pacientes con EA en comparación con sujetos sanos [6].

### **2.3.4. Evidencia de la acción de *T. denticola* en la EA**

Estudios previos demostraron que *T. denticola* indujo la acumulación de los péptidos A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42, en el hipocampo de ratones C57BL/6, mediante la regulación positiva de la  $\beta$ -secretasa BACE1 y PS1 [3].

*T. denticola* también indujo la hiperfosforilación de la proteína Tau, lo cual llega a formar ovillos neurofibrilares, como en el caso de *P. gingivalis* [4]. Aquello se demostró con un experimento *in vitro* con células N2a de neuroblastoma de ratón y células BV2 microgliales murinas, incubadas con una suspensión de *T. denticola*, para verificar los mecanismos subyacentes [3][4].

Cabe destacar que en el trabajo de Tang y col., no se observaron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de la proteína Tau entre *P. gingivalis* y *T. denticola*. Ello sugiere que ambas bacterias contribuirían a la fisiopatología de la EA de la misma manera. Asimismo, no se encontró que ambas bacterias ejerzan un efecto sinérgico, por lo que no se considera que cooperen juntas [3][4].

### III. Proteasas de *T. denticola* y *P. gingivalis*

#### 3.1. Proteasas de *T. denticola*

Al igual que otras bacterias, *T. denticola* tiene ciertos factores de virulencia, como proteasas, que utilizan para infectar y sobrevivir en el huésped. Dentro de las proteasas de *T. denticola* mejor descritas están las dentilisinas, hemolisinas y dentipaínas, las cuales son clasificadas dentro del grupo de enzimas que generan citotoxicidad.

##### 3.1.1. Dentilisina

Pertenece a la familia serin proteasas, es codificada por el gen *ptrp* de la bacteria *T. denticola*, y su principal actividad es inducir la producción de citoquinas inflamatorias y la degradación de sustratos sintéticos como fenilalanina y prolil-leucina, y sustratos naturales como fibronectina, laminina y colágeno tipo IV del sujeto. La actividad sobre los sustratos naturales podría estar involucrada en la destrucción de tejido muscular para facilitar la virulencia. También hidroliza el fragmento humano C3 e induce la activación de células polimorfonucleares, lo cual induce la creación de metaloproteasa-9 que está involucrada en la progresión de la periodontitis [22].

##### 3.1.2. Hemolisina

La hemolisina es una proteína hemolítica, perteneciente a la familia de metaloproteasas, cuya actividad principal es lisar los eritrocitos humanos. La actividad de la hemolisina, es usada para eliminar el sulfhidrilo y amino grupos de compuestos de azufre para producir piruvato, amoníaco e hidrógeno sulfuro, los cuales son altamente tóxicos para el organismo humano. Asimismo, la adición de hemolisina y L-cisteína a las células del ligamento periodontal humano inducen apoptosis [22].

##### 3.1.3 Dentipaína

La dentipaina es una cisteína proteasa homóloga a la cisteína proteasa de *Streptococcus pyogenes*. Estas dentipainas se destacan por la escisión en la cadena b de la insulina, una actividad que es inhibida por E-64. No obstante, en el trabajo de Ishaira y co. del 2010, no se detectó la escisión de otros sustratos proteicos, lo que sugiere que la dentipaina tiene actividad oligopeptidasa [23].

### **3.2. Proteasas de *P. gingivalis***

#### **3.2.1. Gingipainas**

Las gingipainas son una familia de cisteína proteasas que son secretadas por *P. gingivalis* y pueden ser liberadas como proteínas solubles en el medio ambiente o mediante OMVs [24]. Estas proteasas, además de ser el principal factor de virulencia de *P. gingivalis*, son indispensables para su supervivencia puesto que producen péptidos que ayudan en el crecimiento de la bacteria, la invasión de tejidos y la modulación de la respuesta del huésped [2][24].

Se dividen en dos grupos de acuerdo a su capacidad de escindir péptidos en el extremo C-terminal de la lisina (Kgp) o arginina (RgpA o RgpB). La RgpA, a diferencia de las RgpB, puede formar un gran complejo no covalente con dominios catalíticos y de adhesión a hemaglutinina llamado HRgpA [25]. En cambio, RgpB es una proteína de cadena sencilla que posee una secuencia parecida a la del dominio catalítico de RgpA, mientras que las Kgp también poseen un dominio de adhesión a hemaglutinina [25].

Las gingipainas han sido encontradas en cerebros *post mortem* de pacientes con EA. Así, se encontró Kgp en la corteza cerebral y RgpB en el hipocampo, astrocitos y neuronas, ambas gingipainas se colocalizan con los ovillo de Tau y A $\beta$  intraneuronal [2]. Además, se observó que las gingipainas Kgp y RgpB son capaces de cortar a la proteína Tau en péptidos neurotóxicos [2].

## 2. Problema de investigación

La EA es una patología neurodegenerativa de gran interés en el campo de la salud mental. Por lo general, se diagnostica tardíamente ya que sus síntomas se manifiestan de manera progresiva y silenciosa, pudiendo llegar a un estado senil crítico. Esta es la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia a nivel mundial, que afecta a 46.6 millones de personas alrededor del mundo y en el Perú, aprox. 200 mil personas [26][27].

Se ha reportado que la EA tiene una relación estrecha y directa con la disbiosis oral [13][5]. Dicha asociación es novedosa y ha abierto una nueva línea de investigación en la EA, pues esta patología era considerada como condición crónica originada por alteraciones genéticas, más no guardaba relación con agentes infecciosos. A la fecha, sin embargo, no se ha demostrado que los microorganismos causantes de la PC originen la EA. No obstante, la relación PC-EA es de suma importancia ya que, la PC puede evitarse con una adecuada higiene bucal o bien aliviarse con tratamiento.

Tras dichos hallazgos, se han investigado los diferentes factores de virulencia de las bacterias de la microbiota oral, que podrían participar en la fisiopatología de la EA [16]. Por ejemplo, *P. gingivalis* y *T. denticola*, ambas causantes de la PC, se han encontrado en cerebros de pacientes con EA. En el caso de la primera, sus enzimas denominadas gingipaínas son factores neurotóxicos, ya que estimulan la creación de ovillos neurofibrilares, la acumulación de  $\beta$ -amiloides e hiperfosforilación de Tau [2]. Por su parte, *T. denticola*, actúa directamente en las neuronas, induciendo en ellas la acumulación de péptidos neurotóxicos A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en el hipocampo de ratones y promoviendo la hiperfosforilación de proteínas Tau, lo que sugiere un posible rol de esta bacteria en la neurodegeneración [3][4].

No obstante, en estos estudios se menciona vagamente la capacidad de las bacterias de generar agregados neurotóxicos por medio de la escisión de proteínas del SNC. En el caso de *P. gingivalis*, se ha demostrado que las gingipaínas son capaces de escindir a la proteína Tau [2]. Recientemente, se han propuesto un grupo de proteínas sobreexpresadas en tejido nervioso infectado con *P. gingivalis* como posibles dianas de las gingipaínas [7]. Sin embargo, dicha selección se basó en la simple observación de la abundancia de residuos de arginina y lisina, aminoácidos predominantes en el sitio de corte de las gingipaínas, mas no siguió un protocolo *in silico* con estimaciones basadas en los patrones de corte de cada una de esas proteínas propuestas. Queda por conocerse, por lo tanto, si dichas dianas candidatas poseen patrones de corte de las gingipaínas u otras cys proteasas de *P. gingivalis*. Así mismo, no se sabe si existen proteínas, en el tejido nervioso con EA y normal, con patrones reconocibles por gingipaínas u otras Cys proteasas de *P. gingivalis*, información que podría conseguirse aplicando un protocolo *in silico* riguroso.

En cuanto a *T. denticola*, su presencia ha sido demostrada por técnicas moleculares en cerebros de pacientes con EA, pero no así la presencia de sus proteasas en dichos tejidos. Dado que es un agente etiológico de la PC, al igual que *P. gingivalis*, es plausible que también *T. denticola* secreta proteasas en el tejido nervioso, pudiendo así digerir algunas proteínas del SNC. Si las proteasas de *T. denticola* reconocen proteínas del tejido nervioso es aún algo desconocido. Considerando este vacío de conocimiento, proponemos realizar una investigación exploratoria íntegramente teórico computacional con análisis secundario de datos abiertos, que incluya la búsqueda de dianas de proteasas de *T. denticola* en el tejido nervioso afectado en la EA. Nos proponemos predecir las dianas de cistein proteasas de *Porphyromonas gingivalis* y de serín proteasas de *Treponema denticola* en el tejido nervioso empleando una aproximación *in silico*. Ello generaría resultados preliminares que tendrían que validarse en un futuro, mediante estudios experimentales *in vitro*, con las proteasas de interés.

Conocer si estas bacterias poseen enzimas que puedan escindir proteínas en el tejido nervioso es importante ya que genera una advertencia acerca del potencial daño que pueden ocasionar dichos microorganismos en el cerebro. Asimismo, nuestros resultados podrían predecir si las proteasas de *T. denticola* y *P. gingivalis* tienen dianas no sólo vinculadas a la patogénesis de la EA, sino implicadas en otras enfermedades degenerativas diferentes a la EA. Más aún, siendo microorganismos controlables mediante una correcta higiene bucal, el conocer si son capaces de digerir factores nerviosos abrirá una nueva línea de investigación en torno a agentes infecciosos y sus factores de virulencia como causantes de neurodegeneración.

Finalmente, cabe resaltar que existe una gran necesidad de investigaciones en torno a enfermedades neurodegenerativas debido a su alta prevalencia mundial y a la ausencia de una cura definitiva. Investigaciones *in silico*, como la nuestra, buscan aprovechar datos existentes revelados por investigaciones previas y darles un nuevo uso, en torno a un problema latente. Ello es posible mediante métodos computacionales de análisis genómico, proteómico, estructural y mecanístico. En conjunto, estudios teóricos como el nuestro reúnen evidencia que posteriormente podrá ser validada experimentalmente, contribuyendo así a la generación de nuevo conocimiento científico en el campo de la neurociencia.

### 3. Estrategia de abordaje

El estudio es íntegramente *in silico*, basado en el análisis de secuencias, a través del uso de programas bioinformáticos (Anexo 1). Para empezar, se predecirán los sustratos de proteasas, tanto por familia como de forma individual, en las dos bacterias de interés. Ello incluirá: i) un análisis general, basado en la predicción de sustratos de la familia de cys proteasas de *P. gingivalis* y de ser proteasas de *T. denticola* y ii) un análisis específico, basado en la predicción de sustratos de gingipaínas y factores de virulencia de *T. denticola* (incluidas dentilisina, dentipaína y hemolisina).

Para el análisis general, primero se obtendrán el nombre y las secuencias de las proteínas más abundantes en las regiones del cerebro afectadas en la EA, incluidas el hipotálamo y el neocortex. La abundancia de dichas proteínas será determinada tanto en tejido nervioso normal (según datos extraídos del Human Proteome Map (HPM) y The Human Protein Atlas (HPA) y como en tejido nervioso con EA (según datos disponibles en HPA y publicaciones como la de McKetney y colaboradores) [28].

Se elegirán proteínas con patrones reconocidos por las proteasas de interés, consultando MEROPS. Con el fin de conocer si las proteínas seleccionadas en el paso anterior son digeridas por las proteasas del estudio, las mismas serán sometidas al análisis de digestión usando herramientas bioinformáticas como Peptide cutter, PROSPER, PROSPERous y Protein Digest, eligiendo la familia de proteasas y el microorganismo de interés. El resultado serán posibles sustratos, presentes en tejido nervioso, de proteasas de *P. gingivalis* y *T. denticola*.

Para el análisis individual, se aplicará el método de predicción de sustratos putativos en el programa PNSAS, el cual evalúa algunas propiedades como la superficie accesible al solvente de las proteasas de interés. Se ingresarán los códigos PDBs de las gingipaínas de *P. gingivalis* así como dentilisina y hemolisina de *T. denticola*. El resultado será contrastado con las proteínas predichas en la etapa de análisis general. Se determinará la riqueza en Arg y Lys de los polipéptidos predichos (patrón de corte de gingipaínas) con el objetivo de acortar la búsqueda. Se contrastará este resultado con las proteínas predichas de *P. gingivalis* por Patel y colaboradores [7]. Para conocer el patrón de las proteasas de *T. denticola*, se consultará MEROPS y BRENDA, las cuales proveen información detallada sobre las enzimas, sus sustratos y la catálisis enzimática.

Finalmente, para complementar los resultados, se determinarán ciertas características vinculadas con los péptidos neurotóxicos incluidas la probabilidad de agregación (con PASTA2), neurotoxicidad (con ToxinPred2) y características compatibles con AMPs (con) en los productos de corte predichos.

## Referencias bibliográficas:

1. Yagami, T., Yamamoto, Y., & Koma, H. Pathophysiological roles of intracellular proteases in neuronal development and neurological diseases. *Molecular neurobiology*. 2018, 56(5), 3090-3112.
2. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*. 2019;5(1).
3. Su, X., Tang, Z., Lu, Z., Liu, Y., He, W., Jiang, J., Zhang, Y. & Wu, H. Oral *Treponema denticola* infection induces A $\beta$ 1–40 and A $\beta$ 1–42 accumulation in the hippocampus of C57BL/6 mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2021, 71(7), 1506-1514.
4. Tang, Z., Cheng, X., Su, X., Wu, L., Cai, Q., & Wu, H. *Treponema denticola* Induces Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation by Activating Hippocampal Neuroinflammation in Mice. *Journal of Dental Research*, 2022.
5. Liccardo, D., Marzano, F., Carraturo, F., Guida, M., Femminella, G. D., Bencivenga, L., Agrimi, J., Addonizio, A., Melino, I., Valletta, A., Rengo C., Ferrara N., Rengo G., & Cannavo, A. (2020). Potential bidirectional relationship between periodontitis and Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology*. 2020, 11, 683.
6. Riviere, G. R., Riviere, K. H., & Smith, K. S. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral microbiology and immunology*, 2002, 17(2), 113-118.
7. Patel, S., Howard, D., Chowdhury, N., Derieux, C., Wellslager, B., Yilmaz, Ö., & French, L. Characterization of human genes modulated by *Porphyromonas gingivalis* highlights the ribosome, hypothalamus, and cholinergic neurons. *Frontiers in immunology*, 2021, 12, 2165.
8. Hook, V. Y. Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases. *Cellular and molecular neurobiology*. 2006, 26(4), 447-467
9. Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, 2019, Volume 14, 5541–5554.
10. De Strooper B. Proteases and proteolysis in alzheimer disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiological Reviews*. 2010;90(2):465–94.
11. Andrew, R. J., Kellett, K. A., Thinakaran, G., & Hooper, N. M. A Greek tragedy: the growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(37), 19235-19244.
12. Jungbauer G, Stähli A, Zhu X, Auber Alberi L, Sculean A, Eick S. Periodontal microorganisms and Alzheimer disease - A causative relationship? *Periodontol 2000*. 2022 Mar 4.

13. Borsa, L., Dubois, M., Sacco, G., & Lupi, L. Analysis the link between periodontal diseases and Alzheimer's disease: A systematic review. *International journal of environmental research and public health*. 2021, 18(17), 9312.
14. Deo, P. N., & Deshmukh, R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. 2019. 23(1), 122.
15. Kaliamoorthy S., Nagarajan M., Sethuraman V., Jayavel K., Lakshmanan V., Palla S. Association of Alzheimer's disease and periodontitis - a systematic review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Dental medicine*. 2022.
16. Wang, R. P.-H., Ho, Y.-S., Leung, W. K., Goto, T., & Chang, R. C.-C. . Systemic inflammation linking chronic periodontitis to cognitive decline. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2019.
17. Kamer, A. R., Craig, R. G., Pirraglia, E., Dasanayake, A. P., Norman, R. G., Boylan, R. J., Nehorayoff, A., Glodzik, L., Brys, M. & de Leon, M. J. TNF- $\alpha$  and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *Journal of neuroimmunology*. 2009, 216(1-2), 92-97.
18. Miklossy, J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2011, 13, E30.
19. Seymour T, Zhang J. Porphyromonas gingivalis in the pathogenesis of alzheimer's disease and its therapeutic target. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*. 2021;000(000):000.
20. Yamada C., Akkaoui J., Ho A., Duarte C., Deth R., Kawai T., Nichols F., Lakshmana MK., Movila A. Potential Role of Phosphoglycerol Dihydroceramide Produced by Periodontal Pathogen Porphyromonas gingivalis in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Immunol*. 2020 Nov 23;11:591571. doi: 10.3389/fimmu.2020.591571. PMID: 33329577; PMCID: PMC7719741.
21. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis*. 2013;36(4):665-77. doi: 10.3233/JAD-121918. PMID: 23666172.
22. Ishihara K. Virulence factors of Treponema denticola. *Periodontology* 2000. 2010;54(1):117-35.
23. Ishihara, K., Wawrzonek, K., Shaw, L. N., Inagaki, S., Miyamoto, M., & Potempa, J. . Dentipain, a Streptococcus pyogenes IdeS protease homolog, is a novel virulence factor of Treponema denticola. *Biological Chemistry*, 2010, 391(9).
24. Ciaston I., Budziaszek J., Satala D., Potempa B., Fuchs A., Rapala-Kozik M., Mizgalska D., Dobosz E., Lamont RJ., Potempa J., Koziel J. Proteolytic Activity-Independent Activation of the Immune Response by Gingipains from Porphyromonas gingivalis. *mBio*. 2022 Jun

- 28;13(3):e0378721. doi: 10.1128/mbio.03787-21. Epub 2022 May 2. PMID: 35491845; PMCID: PMC9239244.
25. Hočevár, K., Potempa, J., & Turk, B. Host cell-surface proteins as substrates of gingipains, the main proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Biological chemistry*, 2018, 399(12), 1353-1361.
26. Bright Focus Foundation BFF. Enfermedad de Alzheimer: Datos y cifras [Internet]. Enfermedad de Alzheimer: Datos y Cifras | BrightFocus Foundation. 2021 [Citado el 14 de Marzo]. Disponible en: <https://www.brightfocus.org/espanol/alzheimer/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/enfermedad-de-alzheimer-datos-y-cifras#:~:text=Se%20cree%20que%20en%20todo,de%20Alzheimer%20u%20otras%20demencias.&text=Para%20el%202030%2C%20si%20no,casi%20los%2074%2C7%20millones.&text=Para%20el%202050%2C%20las%20tasas,superar%20los%20131%2C5%20millones>
27. Minsa. Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores en Perú, según MINSA [Internet]. Clínica Good Hope. 2021 [Citado el 14 de Marzo]. Disponible en: [https://www.goodhope.org.pe/blog/alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru/#:~:text=En%20el%20Per%C3%BA%20m%C3%A1s%20de,Ministerio%20de%20Salud%20\(MInsa\)](https://www.goodhope.org.pe/blog/alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru/#:~:text=En%20el%20Per%C3%BA%20m%C3%A1s%20de,Ministerio%20de%20Salud%20(MInsa))
28. McKetney, J., Runde, R. M., Hebert, A. S., Salamat, S., Roy, S., & Coon, J. J. Proteomic atlas of the human brain in Alzheimer's disease. *Journal of proteome research*, 2019, 18(3), 1380-1391.

## Anexos

### ANEXO 1

**Tabla 1.** Herramientas bioinformáticas

<b>Base de Datos</b>	<b>Sitio web</b>
MEROPS	<a href="https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml">https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml</a>
Peptide Cutter	<a href="https://web.expasy.org/peptide_cutter/">https://web.expasy.org/peptide_cutter/</a>
PROSPER	<a href="https://prosper.erc.monash.edu.au/">https://prosper.erc.monash.edu.au/</a>
PROSPERous	<a href="http://prosperous.erc.monash.edu/">http://prosperous.erc.monash.edu/</a>
Protein Digest	<a href="https://www.nextprot.org/help/protein-digestion">https://www.nextprot.org/help/protein-digestion</a>
PNSAS	<a href="http://www.actrec.gov.in/psp_tool/pnsas.php">http://www.actrec.gov.in/psp_tool/pnsas.php</a>
BRENDA	<a href="https://www.brenda-enzymes.org/index.php">https://www.brenda-enzymes.org/index.php</a>
PASTA2	<a href="http://old.protein.bio.unipd.it/pasta2/">http://old.protein.bio.unipd.it/pasta2/</a>
ToxinPred2	<a href="https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred2/">https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred2/</a>
APD3	<a href="https://aps.unmc.edu/">https://aps.unmc.edu/</a>