

LIGAÇÃO DE PIPERINA EM RNA POLIMERASE DE *Mycobacterium tuberculosis* E *Mycobacterium leprae*

Giulienne Karla Pereira da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), João Vítor Perez de Souza; Letícia Sayuri Murase; Carolina Trevisolli Palomo; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli; Regiane Bertin de Lima Scodro; Vera Lúcia Dias Siqueira; Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas, Microbiologia.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, piperina.

Resumo

Mycobacterium tuberculosis e *Mycobacterium leprae*, ambos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, são bactérias causadores da tuberculose e da hanseníase, respectivamente. Tais doenças são de preocupação mundial, principalmente em países subdesenvolvidos. Piperina (PIP) é um composto alcaloide orgânico com amplo espectro de atividades farmacológicas, além de demonstrar sinergismo com rifampicina (RIF) em *M. tuberculosis*. O objetivo deste estudo foi avaliar se PIP possui sítio de ligação na RNA polimerase de *M. tuberculosis* e *M. leprae*, a fim de esclarecer o mecanismo de ação relacionado com o sinergismo entre RIF e PIP. Utilizando simulações de *docking* molecular revelaram modo de ligação estável e reprodutivo, sugerindo que PIP partilha do mesmo sítio de ligação de 88G na RNA polimerase micobacteriana.

Introdução

O gênero *Mycobacterium* é composto por mais de 200 espécies, dentre as quais destacam-se o Complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, responsáveis por causar tuberculose (TB) e hanseníase (HS), respectivamente (MURRAY et al., 2017). A TB acomete principalmente os pulmões e seu desenvolvimento está ligado a características genéticas dos indivíduos, ambiente e aglomerados humanos (MURRAY et al., 2017). Já a HS, compromete principalmente a pele, nervos periféricos e as membranas mucosas o que afeta a capacidade produtiva do indivíduo, e também se relaciona o seu desenvolvimento a características genéticas dos indivíduos, ambiente e aglomerados humanos. Embora a TB seja de fácil diagnóstico laboratorial e o bacilo é cultivado *in vitro*, a HS apresenta um diagnóstico

mais complexo, pois o bacilo não pode ser cultivado *in vitro* até o momento (VERITHI et al., 2018). A terapêutica de ambas as doenças é longa e trazem diversos efeitos colaterais, fazendo com que muitos pacientes desistam antes do término adequado deste. A desistência do tratamento por parte dos pacientes possibilita a seleção bacilos resistentes e consequentemente a diminuição de medicamentos eficazes para o tratamento dessas doenças.

Recentemente, a piperina (PIP), um composto alcaloide orgânico com diversas propriedades biológicas ativas, apresentou importante atividade anti-*M. tuberculosis* (HEGETO et al., 2018). Para aumentar o potencial de inibição do crescimento do patógeno a PIP foi combinada a rifampicina (RIF), um fármaco importante no tratamento da TB e da HS (BALAKRISHNAN; VARMA; CHATTERJI, 2001).

Mesmo com resultados promissores já relatados, ainda não há clareza na explicação mecanística do efeito modulatório da PIP na ação da RIF em *M. tuberculosis*. Considerando a literatura disponível até a presente data, foi levantada a hipótese que PIP pode se ligar na RNA polimerase micobacteriana e auxiliar na inibição da transcrição de RNA exercida pela RIF (BALAKRISHNAN; VARMA; CHATTERJI, 2001) levando assim a morte bacteriana.

Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar a possível existência de um sítio de ligação de PIP na RNA polimerase de *M. tuberculosis* e *M. leprae* utilizando metodologias computacionais de *docking* molecular.

Materiais e métodos

Docking molecular de PIP em M. tuberculosis

A estrutura cristalizada do complexo transcricional de *M. tuberculosis*, complexada com os ligantes RIF e N-alfa-(benzenocarbonil)-N-(2-metilfenil)-D-fenilalaninamida (88G) foi selecionada (código 5ughg) (Lin et al., 2017). Foi realizado o *downloading* da estrutura foi e preparada para as simulações de *docking* molecular. O ensaio computacional foi realizado em dois diferentes programas. As análises no Autodock 4.2.3 foram realizadas na interface gráfica Pyrx, que utilizou o algoritmo padrão de pesquisa centralizada no ligante 88G (dimensões 50, 50, 50, em x, y e z, respectivamente) com espaçamento de grade de 0,375.

Já no software Molgro-6.0 utilizamos os otimizadores Moldock e PLANTS SCORE para a pesquisa e classificação, respectivamente. O raio de busca foi de 10 Å centrado no ligante 88G. Os ensaios do *docking* foram validados por meio de *redocking* do ligante de referência, 88G. Todas as simulações foram realizadas cinco vezes e os resultados foram semelhantes em todas elas.

Modelagem da RNA polimerase de *M.leprae*

Realizou-se a moldagem da RNA polimerase (RNAP) de *M. leprae* utilizando como referência a estrutura de RNAP de *M. tuberculosis*. A sequência de aminoácidos de cada subunidade de RNAP de *M. leprae* (cepa TN) foram obtidas pelo banco de dados UniProt (rpoA: Q9X798 – subunidade α ; rpoB: P30760 – subunidade β ; rpoC:P30761 – subunidade β' ; rpoZ: Q9CCQ6 – subunidade ω ; rpoT: Q7AQB1 _ fator σ). Em seguida, realizou-se um alinhamento entre as sequências de *M. leprae* e *M. tuberculosis* por meio da ferramenta Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos foram substituídos por mutações pontuais fazendo o uso das coordenadas espaciais de 5uhg por meio do programa Coot-0.7.2.

Resultados e Discussão

Como resultados das simulações iniciais, PIP se ligou de forma semelhante ao ligante de referência (88G) no complexo transcricional de *M. tuberculosis*, apresentando modo de ligação estável nas cinco simulações realizadas (Tabela 1). A partir das conformações da estrutura cristalográfica da RNAP de *M. tuberculosis* em complexo com RIF e 88G, foram geradas as estruturas modeladas nas mesmas conformações da RNAP de *M. leprae* em complexo com RIF e 88G (Tabela 2).

Foram realizadas simulações de *docking* molecular para a enzima de RNAP *M. leprae* e os resultados foram satisfatórios. PIP se ligou de maneira estável e semelhante ao ligante de referência, de forma reprodutível nos ensaios.

Considerando os resultados obtidos nas simulações com as enzimas RNAP dos dois patógenos, supomos que PIP compartilha o mesmo sítio de ligação de 88G na RNAP micobacteriana.

Anteriormente, PIP demonstrou atividade sinérgica contra *M. tuberculosis in vitro* em combinações com RIF e estreptomicina, significativamente reduzindo os valores de concentração inibitória mínima desses antimicrobianos com *M. tuberculosis*. Além disso, diversos estudos já mostraram atividades interessantes de PIP para compor um possível regime de tratamento conjunto contra micobactérias.

Tabela 1 – *Docking* scores dos ligantes 88G e piperina no sítio de ligação de 88G na RNA polimerase de *M. tuberculosis* e *M. leprae*.

Molécula	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. leprae</i>	
	Autodock	Molegro	Autodock	Molegro
88G	11,4±0,013	153±4	11,4±0,30	154,4±3,90
Piperina	9,2±0,03	118,5±3	9,45±0,16	117,8±3,1

Conclusões

O tratamento de infecções causadas por micobactérias apresenta complicações quanto a duração e surgimento de cepas resistentes. O descobrimento de moléculas, como a PIP, que apresentem benefícios em esquemas terapêuticos conjuntos é de suma importância. Com este trabalho, propomos possível explicação mecanística da interação sinérgica entre RIF e PIP em micobactérias e assim fortalecemos PIP como possível candidato à fármaco anti-TB.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a PPG/UEM e a Fundação Araucária (FA) pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

Referências

BALAKRISHNAN, V.; VARMA, S.; CHATTERJI, D. Piperine augments transcription inhibitory activity of rifampicin by severalfold in *Mycobacterium smegmatis*. **Current Science**, v. 80, n. 10, p. 1302–1305, 2001.

HEGETO, L. A. et al. In vitro combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 111, n. February, p. 35–40, 2018.

LIN, Wei et al. Structural basis of *Mycobacterium tuberculosis* transcription and transcription inhibition. **Molecular cell**, v. 66, n. 2, p. 169-179. e8, 2017.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

VEDITHI, S. C. et al. Structural Implications of Mutations Conferring Rifampin Resistance in *Mycobacterium leprae*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.