

# EXPLORANDO OS ALVOS MOLECULARES DA AÇÃO ANTIVIRAL DE COMPLEXOS DE Pd(II) COM AMINOADAMANTANOS SOBRE O VÍRUS SARS-COV-2

Palavras-Chave: SARS-COV-2, Aminoadamantanos, Paládio(II)

Autores(as):

Laura Barros Silva, IQ – UNICAMP

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (orientador), IQ – UNICAMP

Dr. Raphael Enoque Ferraz de Paiva, DIPC – Universidad del Pais Vasco

Dr. Douglas Hideki Nakahata, DIPC – Universidad del Pais Vasco

Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

## INTRODUÇÃO:

Os aminoadamantanos, como a amantadina, a memantina e a rimantadina, são moléculas obtidas a partir da funcionalização do adamantano. A amantadina (atd) e a rimantadina (rtd) são utilizadas como agentes na prevenção e tratamento de infecções pelo vírus Influenza A, enquanto a memantina (mtn) é utilizada para tratar condições neurodegenerativas como a doença de Alzheimer [1], [2]. O Pd(II) possui estrutura eletrônica e modos de coordenação semelhantes à Pt(II), além de possuir atividades antineoplásicas e antimicrobianas conhecidas, o que motiva a coordenação dos aminoadamantanos a esse metal como estratégia para aumentar suas atividades antivirais [3]. Recentemente estivemos diante de umas das maiores crises sanitárias já vividas no mundo, causada pelo SARS-COV-2, o que reforça a necessidade da busca constante por novos fármacos para o tratamento de diversos males, com ênfase a doenças infecciosas [4]. Para tal finalidade, modificar fármacos já utilizados na clínica ou coordená-los a metais com reconhecida atividade antimicrobiana são alternativas para desenvolver novas moléculas com potencial farmacológico [5]. Com isso em mente, complexos de Pd(II) com amantadina, memantina e rimantadina foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto às suas atividades antivirais sobre o vírus SARS-COV-2. Os complexos metálicos, denominados Pd-atd, Pd-mtn e Pd-rtd, inibiram significativamente a replicação do SARS-COV-2 em 50,8% (2  $\mu$ M), 97,2% (10  $\mu$ M) e 71,1% (10  $\mu$ M), respectivamente, o que encorajou uma investigação mais aprofundada sobre os possíveis alvos moleculares dos complexos.

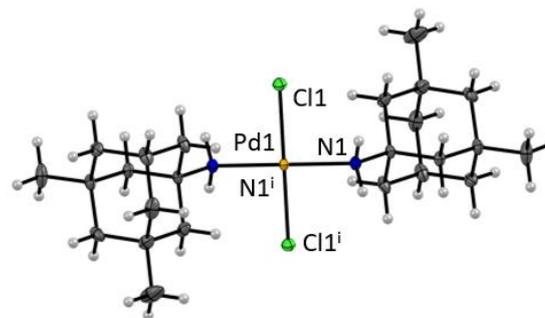


Figura 1: Estrutura cristalina obtida para o complexo de Pd(II) com memantina.

## METODOLOGIA:

**Interação com N-acetil-L-cisteína:** A interação entre os complexos de Pd(II) e o aminoácido N-acetil-L-cisteína (NAC, obtido dos laboratórios Acros Organics) foi monitorada via espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio,  $^1\text{H}$ -RMN. A reação foi primeiramente monitorada via  $^1\text{H}$ -RMN durante 24 horas, a  $37^\circ\text{C}$ . Os equivalentes molares do complexo e NAC foram dissolvidos em DMSO deuterado nas concentrações de  $500\ \mu\text{M}$  na reação com Pd-atd e  $2000\ \mu\text{M}$  nas reações com Pd-rtd e Pd-mtn.

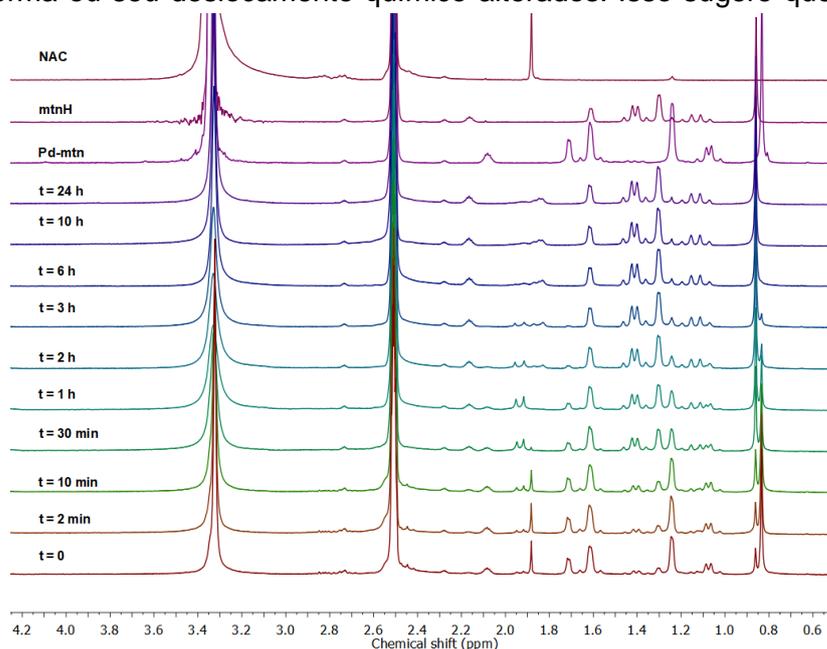
**Interação com DNA:** Experimentos de eletroforese em gel de agarose foram conduzidos para avaliar a interação entre os complexos de Pd(II) e o DNA do plasmídeo pUC19 (obtido da Invitrogen). Os complexos foram solubilizados em DMSO e dissolvidos em água e tampão PBS para as concentrações finais variando de 5 a  $100\ \mu\text{M}$ , para um volume final de amostra de  $20\ \mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas com o plasmídeo (200 ng por amostra) por 2 h a  $37^\circ\text{C}$ , tratadas com corante de carga e aplicadas à matriz de gel de agarose 1,2%, previamente corada com SYBR Safe. A corrida foi conduzida em tampão TAE, com o potencial aplicado de 70 V durante 1 h, e o gel foi fotodocumentado usando um GelDoc-It Imager. Amostras contendo apenas pUC19 ou pUC19 e DMSO foram usadas como controle.

**Inibição da interação entre as proteínas S Spike SARS-CoV-2 e ACE2:** A inibição da interação Spike-ACE2 foi medida usando o kit SARS-CoV-2 Inhibitor Screening Assay (Adipogen, Cat. N° AG-48B-0001-KI01). Todos os reagentes foram usados do mesmo kit durante experimentos individuais e os experimentos foram realizados usando o protocolo do fabricante. Resumidamente, o domínio de ligação do receptor S Spike SARS-CoV-2 (RBD): Fc (humano) (rec.) (SPIKE) foi reconstituído para  $0,1\ \text{mg/mL}$  com água deionizada. Isso foi posteriormente diluído para uma concentração de trabalho de  $1\ \mu\text{g/mL}$  em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e usado recentemente. A placa de ensaio foi revestida com  $100\ \mu\text{L}$ /poço de SPIKE, coberta com um filme plástico e mantida a  $4\ ^\circ\text{C}$  durante a noite. O líquido foi aspirado e qualquer líquido restante foi removido por meio de batidas contra papéis absorventes limpos. A placa foi bloqueada usando  $200\ \mu\text{L}$  de tampão de bloqueio por poço por 2 h em temperatura ambiente. O líquido foi aspirado e os poços foram lavados com tampão de lavagem 1X ( $300\ \mu\text{L}\times 3$  vezes). Todo o líquido foi aspirado e o excesso de líquido foi removido. Os inibidores (complexos metálicos, controles, referência) foram diluídos em solução de mistura de inibidores (IMS), que foi preparada usando ACE2 (humano) (rec.) (biotina) (ACE2) (solução estoque  $0,1\ \text{mg/mL}$ ) para a concentração de trabalho de  $0,5\ \mu\text{g/mL}$  em tampão ELISA 1X. Soluções estoque frescas dos inibidores foram feitas em DMSO ou água (Pd-atd, Pd-mtn, Pd-rtd, atdH, mtnH, rtdH e  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ ) e a concentração final do veículo nos poços foi de 0,5%. Os inibidores diluídos em IMS foram adicionados aos poços ( $100\ \mu\text{L}$ /poço). As concentrações finais dos inibidores foram de  $100\ \mu\text{M}$  para a triagem de dosagem única. Os poços de controle negativo também foram tratados com 0,5% de DMSO em IMS. A placa foi coberta com um filme plástico e incubada a  $37\ ^\circ\text{C}$  por 1 h, após o que a etapa de aspiração/lavagem foi repetida. Em seguida, a estreptavidina marcada com peroxidase de raiz-forte (HRP) foi reconstituída com  $100\ \mu\text{L}$  de tampão

ELISA 1X e posteriormente diluída para uma concentração de trabalho pela adição de 50  $\mu\text{L}$  em 10 mL de tampão ELISA 1X (diluição 1:200). Foi coberta com um filme plástico e incubada à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, a etapa de aspiração/lavagem descrita anteriormente foi repetida. O desenvolvimento do substrato foi conduzido pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) pronta para uso a cada poço por 5 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  5M). A OD foi medida a 450 nm usando um espectrofotômetro UV-visível BioTek Sinergy H4 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). O valor de absorvância individual do poço em branco foi subtraído dos outros valores de absorvância e a porcentagem da atividade restante foi calculada em relação aos valores de controle não tratados. Todos os tratamentos foram feitos em duplicatas e dois experimentos independentes foram realizados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O aminoácido N-acetil-L-cisteína foi utilizado como modelo (molécula pequena) para se avaliar a possível interação dos complexos de Pd(II) com peptídeos e proteínas. Nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN medidos ao longo do tempo, é possível observar a diminuição dos sinais pertencentes ao aminoadamantano coordenado e o aumento dos sinais pertencentes à sua forma livre. Além disso, os sinais pertencentes ao NAC têm sua forma ou seu deslocamento químico alterados. Isso sugere que nessa reação os ligantes aminoadamantanos são substituídos por uma molécula de N-acetil-L-cisteína. A reação começa imediatamente após a mistura dos reagentes e termina após 6 h para Pd-mtn, como mostrado na Figura 2, após 30 minutos para Pd-atd e após 3 h para Pd-rtd. Isso sugere que os resíduos de cisteína da proteína podem ser locais de interação com os complexos e, portanto, essa biomolécula pode ser um possível alvo celular para os complexos de Pd(II).



**Figura 1:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN monitorando a reação entre Pd-mtn e NAC de  $t = 0$  a  $t = 24$  h.

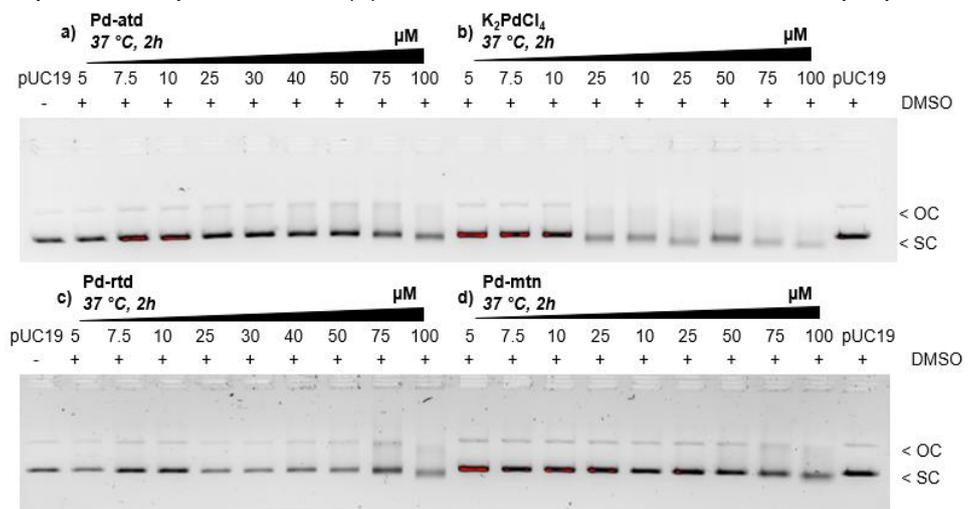
Para avaliar a interação com nucleotídeos como um possível mecanismo para sua ação antiviral, os complexos de Pd(II) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose com DNA plasmidial. A Figura 3 representa os resultados obtidos para os complexos e para o sal de partida  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ , que foi usado na síntese dos complexos. À medida que a concentração dos compostos aumenta, é possível observar a alteração no perfil eletroforético da banda superenovelada (SC, do inglês *supercoiled*) do plasmídeo, pois sua intensidade

diminui e um rastro (*smearing*) se torna observável, o que é uma característica da interação de íons metálicos ao DNA plasmidial. No entanto, embora esse efeito esteja presente apenas em concentrações mais altas para os complexos (acima de 75  $\mu\text{M}$ ), para o sal de Pd(II) esse efeito está presente desde 25  $\mu\text{M}$  e com maior intensidade. Isso indica que o sal de partida é mais suscetível a interagir com o DNA, e que a coordenação dos aminoadamantanos ao Pd(II) diminui sua afinidade com essa biomolécula. Assim, os resultados sugerem que os complexos de Pd(II) com aminoadamantanos são mais propensos a interagir com peptídeos do que com nucleotídeos, e que o DNA não é um alvo molecular primário responsável pela atividade dos complexos.

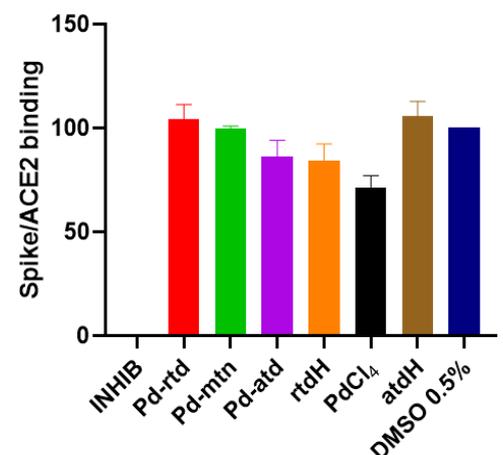
A entrada do SARS-CoV-2 nas células-alvo é facilitada pela proteína spike (S) dos coronavírus e mediada pela enzima conversora

de angiotensina 2 (ACE2) como receptor de entrada [6]. Assim, inibir a ligação entre Spike e ACE2 seria um possível mecanismo para os complexos prejudicarem a entrada viral nas células. Para a triagem dos complexos Pd(II) para inibidores da interação S/ACE2, foi utilizado um ensaio ELISA, que mede a interação do RBD da proteína S do SARS-CoV-2 com o receptor ACE2. Na Figura 4, os resultados da triagem, cada um referente a um experimento independente, para os complexos Pd(II) e os precursores podem ser encontrados.

Os compostos testados não apresentaram atividade significativa, o que é consistente com os dados obtidos por Butterworth [2]. O sal de Pd(II) apresentou atividade moderada de cerca de 30% de inibição, porém não o suficiente para conduzir experimentos adicionais para determinar valores de  $\text{IC}_{50}$ , o que é comparável aos resultados obtidos por Ott e colaboradores [6]. Isso indica que a inibição da interação S/ACE2 não é o principal mecanismo de ação antiviral dos complexos de Pd(II) contra o SARS-COV-2, o que, juntamente com os resultados de RMN para a reação com um aminoácido, justifica a avaliação da interação dos complexos com outras proteínas.



**Figura 2:** Eletroforese em gel para avaliar a interação entre DNA plasmídeo (a) Pd-atd (b)  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ , (c) Pd-rtd e (d) Pd-mtn, destacando a banda de DNA superenovelada (SC), a banda de círculo aberto (OC) e a presença (+) ou ausência (-) de DMSO na amostra.



**Figura 3:** Resultados da triagem para os complexos de Pd(II) e seus precursores para inibidores da interação Spike/ACE2.

## CONCLUSÕES:

Três complexos de Pd(II) com aminoadamantanos que se mostraram ativos sobre o SARS-COV-2 foram estudados buscando compreender seus mecanismos de ação. Para investigar os alvos moleculares para sua atividade sobre o vírus SARS-COV-2, foi monitorada a interação entre os complexos e o DNA plasmidial, via eletroforese em gel de agarose, e com o aminoácido N-acetil-L-cisteína, via espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN. Apenas o sal inicial de Pd(II) apresentou interação significativa com o DNA plasmidial, o que indica que o DNA não é um alvo molecular para os complexos testados, enquanto a reação entre os complexos de Pd(II) e NAC foi verificada em DMSO. Os resultados sugerem que a reação em DMSO ocorre com a substituição do ligante aminoadamantano por NAC. Usando a interação com NAC como um modelo de molécula pequena para a interação com proteínas e peptídeos, os resultados indicam que os complexos de Pd(II) com aminoadamantanos são mais propensos a atingir proteínas do que nucleotídeos em seu mecanismo de ação. Para investigar mais a fundo a interação entre os complexos de Pd(II) e proteínas, um ensaio ELISA foi conduzido para avaliar se os complexos eram capazes de inibir a interação entre as proteínas Spike e ACE2, o que permite que o vírus SARS-COV-2 entre na célula humana. Os complexos de Pd(II) mostraram pouca atividade quanto a inibição da interação da proteína Spike com a ACE2.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] PEREIRA, Anna Karla *et al.* **Memantine hydrochloride: a drug to be repurposed against Chikungunya virus?**, Pharmacol Rep, jun. 2021.
- [2] BUTTERWORTH, Robert *et al.* **Potential for the Repurposing of Adamantane Antivirals for COVID-19**, Drugs R D, 2021.
- [3] FIORI-DUARTE, Ana *et al.* **A new palladium(II) complex with ibuprofen: Spectroscopic characterization, DFT studies, antibacterial activities and interaction with biomolecules**, Journal of Molecular Structure, 2019.
- [4] GIL-MOLES, Maria *et al.* **Metallo drug Profiling against SARS-CoV-2 Target Proteins Identifies Highly Potent Inhibitors of the S/ACE2 interaction and the Papain-like Protease PLpro**, Chemistry – A European Journal, 2021.
- [5] DE PAIVA, Raphael *et al.* **What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks**, Dalton Trans., 2020.
- [6] GIL-MOLES, Maria *et al.* **Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics**, Chemistry – A European Journal, 2020.