

Síntese de inibidores de galectina-3 com potenciais aplicações em alterações cardiocirculatórias

Autores: João Victor Silveira Camargo¹, Vanessa Leiria Campo²

Colaboradores: Aline Barbosa Ribeiro³, Lílian Cataldi Rodrigues⁴

^{1,2,3} Centro Universitário Barão de Mauá

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

¹jvcamargo2009@hotmail.com (Medicina), ²vanessa.campo@baraodemaua.br

Resumo

As doenças cardiovasculares, responsáveis por afetarem de maneira contundente a morbimortalidade da população mundial, apresentam, previamente descoberta, uma maior concentração plasmática de galectina-3. Nesse sentido, denota-se uma relação dessa lectina com as alterações cardiocirculatórias. Assim, percebe-se um potencial terapêutico dos inibidores da galectina-3 nas doenças cardiovasculares. Logo, este trabalho objetiva a realização da análise estrutural de galectina-3 e a síntese de compostos inibidores desta proteína, via métodos de química orgânica. Posteriormente, estes inibidores poderão ser aplicados em ensaios biológicos direcionados a alterações cardiovasculares.

Introdução

Ao analisarem dados epidemiológicos do Brasil, Barroso *et al* (2020) destacaram a preponderância, consoante a análise de dados do DataSUS, de doenças cardiovasculares, as quais se apresentam como as responsáveis por causar o maior número de mortes no ano de 2017, cerca de 27,3% em relação a 1.312.663 mortes ao todo. Dentre esses casos, a aterosclerose, a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca e as doenças arteriais coronarianas foram as doenças com maior influência sobre o número de mortes causadas pelas doenças cardiovasculares na realidade brasileira, ainda segundo a avaliação de dados do DataSUS (BARROSO *et al.*, 2020). Logo, entender as manifestações dessas doenças e formas de identificá-las, precocemente, é imprescindível para estabelecer medidas para diminuir sua prevalência sobre a população, afetando, também, a mortalidade da população como um todo.

Dentre essas doenças, pode-se destacar a aterosclerose, a qual se apresenta como um processo inflamatório dos vasos sanguíneos, como as artérias, que se desenvolve com o decorrer do tempo, podendo ocasionar quadros

clínicos mais severos, os quais incluem eventos cardiovasculares secundários, como infarto agudo do miocárdio, dentre outros (SOEHNLEIN & LIBBY, 2021). Essas condições levam à morbimortalidade significativa, podendo acelerar ainda mais o processo aterosclerótico e ocasionar, também, outras complicações (VIOLA & SOEHNLEIN, 2015). Portanto, há uma busca contínua por novos biomarcadores confiáveis que possam melhorar o reconhecimento de eventos associados à aterosclerose em tempo hábil e prever os desfechos clínicos satisfatórios, além de serem alvos terapêuticos no combate a essas doenças.

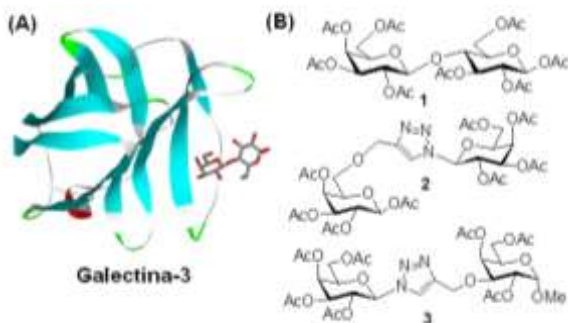
As galectinas são proteínas pertencentes à família das lectinas, apresentando uma alta afinidade por β -galactosídeos (CAMPO *et al.*, 2016). Nesse sentido, hodiernamente, muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de se caracterizar e analisar o papel desempenhado pelos 15 tipos de galectinas já relatadas no organismo humano. Dentre essas galectinas, deve-se destacar a galectina-3, a qual é amplamente estudada devido a sua participação em diversos processos do organismo, como o desenvolvimento e a progressão dos tumores, o desenvolvimento de lesões em uma aterosclerose, a participação nas respostas imunes e inflamatórias, dentre outros (YANG; RABINOVICH; e LIU, 2008). Assim, compreendendo a presença da galectina-3 em processos imunes e inflamatórios, sabe-se, previamente, que o aumento da galectina-3 está relacionado a algumas doenças, de possível desenvolvimento, no sistema circulatório.

Deste modo, a partir da compreensão da presença da galectina-3 em processos inflamatórios e o seu aumento em doenças cardiovasculares, percebe-se que existe uma aplicação potencial dos inibidores sintéticos desses tipos de lectina nos quadros de problemas que envolvam o sistema circulatório humano. Portanto, a síntese desses inibidores se apresenta como uma área de estudo importante e promissora, afinal, tais tipos de doenças apresentam um significativo impacto na morbimortalidade da população mundial.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura proteica da galectina-3 e realizar a síntese de compostos químicos inibidores desta proteína, representados por peracetil-lactose **1**, galactose-triazol-6-O-galactose **2** e galactose-triazol-3-O-galactose-OMe **3**. A estrutura cristalográfica de galectina-3 e as estruturas químicas dos compostos **1 a 3** estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 – (A) Estrutura cristalográfica da Galectina-3; (B) Estruturas químicas dos compostos peracetil-lactose 1, galactose-triazol-6-O-galactose 2 e galactose-triazol-3-O-galactose-OMe 3



Fonte: Os autores

Materiais e Métodos

Os procedimentos biotecnológicos para a análise da estrutura proteica da galectina-3 foram realizados no laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP. As reações químicas para obtenção dos compostos **1 a 3** foram realizadas no laboratório de Química e Bioquímica do CBM. As análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) para comprovação das estruturas químicas obtidas foram realizadas no equipamento Bruker Advance DPX 400 (400 MHz) da FFCLRP-USP.

Análise eletroforética da Galectina-3

A análise do perfil proteico de galectina-3 foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. O gel de poliacrilamida foi feito utilizando o sistema Bio-Rad [reagentes utilizados: Acrilamida 30%, TRIS 1,5M, SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), Persulfato de amônio 10%, TEMED (tetrametiletilenodiamina) e H₂O]. A amostra de galectina-3 foi preparada em tampão de amostra (600 mM Tris-HCl, 12% p/v SDS, 12% v/v β-mercaptoetanol (β-ME), 60% v/v glicerol, 0,3% p/v Azul de bromofenol, pH 6,8) e aquecida a 96 °C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada em condição redutora e desnaturante aplicando-se os parâmetros de corrida de 20 mA por gel e 300 V. A visualização do perfil eletroforético da galectina-3 foi obtida após

coloração com solução Coomassie (0,25% p/v azul brilhante de Coomassie R-250, 30% v/v metanol e 7% v/v ácido acético glacial) (WU *et al.*, 2021)

Síntese dos compostos **1 a 3**

Síntese de peracetil-lactose **1**

O composto lactose **4** (300 mg, 0,87 mmol) foi acetilado com piridina (5 ml) e anidrido acético (5,5 ml), sendo a solução agitada por aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente (RODRIGUES *et al.*, 2023). Em seguida, a mistura foi rotaevaporada à pressão reduzida para remoção do solvente e purificada por coluna cromatográfica clássica utilizando o solvente acetato de etila. Desta forma, o composto peracetil-lactose **1** foi obtido com rendimento quantitativo (590mg, 0,87 mmol).

Síntese de galactose-triazol-6-O-galactose **2**

Uma solução constituída pelos açúcares azido-peracetil-galactose **5** (12 mg, 0,03 mmol) e 1,2,3,4-tetra-O-acetil-6-prop-2-il-D-galactopirranose **6** (12,7 mg, 0,03 mmol), ascorbato de sódio (7 mg, 0,03 mmol) e CuSO₄ (32μL de solução 10 mM 0,003 mmol) em DMF (1,0 mL) foi agitada por 24h à temperatura ambiente e 12h à temperatura de 80°C (MARCHIORI *et al.*, 2017). Em seguida, a mistura foi rotaevaporada a pressão reduzida para remoção do solvente e purificada por coluna cromatográfica clássica utilizando o solvente acetato de etila. Desta forma, o composto **2** foi obtido com rendimento de 41% (10 mg, 0,013 mmol).

Síntese de galactose-triazol-3-O-galactose O-Me **3**

Uma solução constituída pelos açúcares azido-peracetil-galactose **5** (104 mg, 0,28 mmol) e metil-2,4,6-tri-O-acetil-3-prop-2-il-D-galactopirranose **7** (100 mg, 0,28 mmol), ascorbato de sódio (55 mg, 0,28 mmol) e CuSO₄ (0,25 mL de solução 10 mM 0,028 mmol) em DMF (1,5 mL) foi agitada por 24h à temperatura ambiente e 12h à temperatura de 80°C (MARCHIORI *et al.*, 2017). Em seguida, a mistura foi rotaevaporada a pressão reduzida para remoção do solvente e purificada por coluna cromatográfica clássica utilizando o solvente acetato de etila. Desta forma, o composto **2** foi obtido com rendimento de 39% (80 mg, 0,10 mmol).

Resultados e Discussão

A análise da proteína galectina-3 por meio de eletroforese SDS-PAGE foi realizada para a avaliação do seu perfil de pureza após produção a partir de culturas de bactérias transformadas contendo o gene para galectina-3. De acordo com o gel de SDS-PAGE obtido após corrida eletroforética e coloração com solução Coomassie, foi possível observar uma única banda

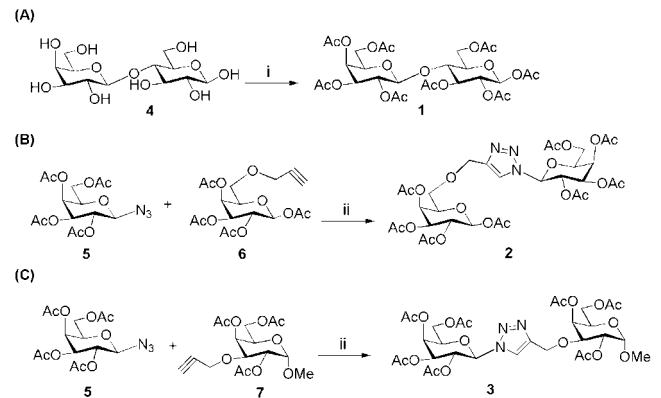
com peso molecular próximo de 28 kDa, o que comprova seu alto grau de pureza e efetividade no processo de produção.

Figura 2- Gel SDS-PAGE de galectina-3 após corrida eletroforética



A síntese dos compostos **1** a **3** inibidores de galectina-3 está fundamentada no reconhecimento efetivo desta lectina por derivados β -galactosídeos. Desta forma, os compostos sintetizados deverão ser capazes de se ligar com alta afinidade no sítio ativo (CRD) de galectina-3, inibindo a sua ligação aos substratos naturais, com consequente redução dos seus efeitos em doenças cardiovasculares. Inicialmente, foi realizada a síntese do composto peracetil-lactose **1** a partir de reação de acetilação dos grupos OH da lactose **4**, utilizando piridina e anidrido acético (RODRIGUES *et al.*, 2023), sendo obtido em rendimento quantitativo, após purificação por coluna cromatográfica, utilizando o solvente acetato de etila (Esquema 1A). A seguir, os compostos galactose-triazol-6-O-galactose **2** e galactose-triazol-3-O-galactose-OMe **3** foram obtidos por reações de ciclo-adição 1,3-dipolar de Huisgen, conhecidas como “click chemistry”, a partir da condensação entre um grupo azido e um acetileno terminal para a geração de um grupo triazol (KOLB; SHARPLESS, 2003). Assim, foram realizadas as reações de “click chemistry” entre o açúcar azido-peracetil-galactose **5** e os açúcares **6** e **7**, contendo grupo alcino, na presença de CuSO_4 / ascorbato de sódio como sistema catalítico. As reações foram realizadas a temperaturas ambiente e 80°C , em períodos que variaram de 24h a 48h (Esquema 1B e 1C) (MARCHIORI *et al.*, 2017). Sob essas condições, os compostos finais **2** e **3** foram obtidos com rendimentos de 41% e 39%, respectivamente, após purificação por coluna cromatográfica, utilizando o solvente acetato de etila.

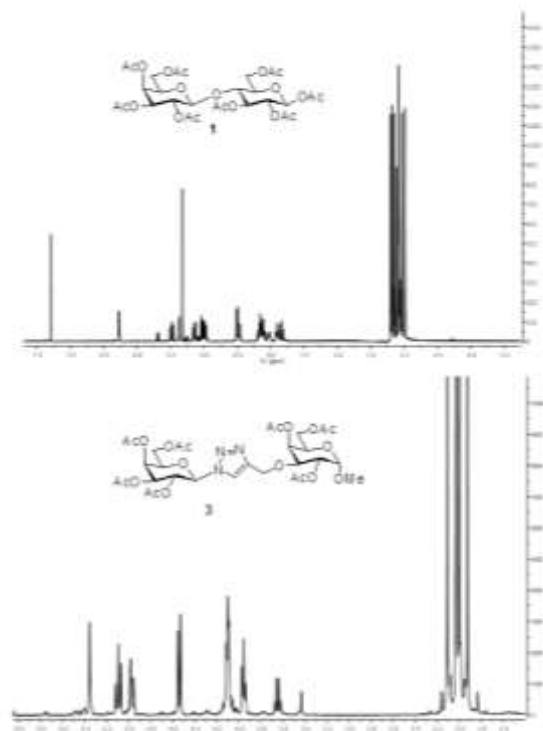
Esquema 1- Síntese dos compostos peracetil-lactose **1 (A), galactose-triazol-6-O-galactose **2** (B) e galactose-triazol-3-O-galactose-OMe **3** (C). Condições reacionais: i. Piridina/ anidrido acético; ii. Ascorbato de sódio/ CuSO_4 , DMF.**



Fonte: Os autores

As estruturas dos compostos **1** a **3** foram comprovadas pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear ($\text{RMN } ^1\text{H}$), os quais apresentaram sinais característicos de grupos químicos destas moléculas, tais como acetil, triazol e hidrogênios referentes aos açúcares lactose e galactose (Figura 3)

Figura 3- Espectros de $\text{RMN } ^1\text{H}$ dos compostos **1 e **3****



Fonte: Os autores

Conclusões

A proteína galectina-3 foi caracterizada por análise eletroforética de SDS-PAGE, sendo comprovado seu alto grau de pureza. As metodologias sintéticas utilizadas foram eficazes para a obtenção dos inibidores de galectina-3 representados por peracetil-lactose **1**, galactose-triazol-6-O-galactose **2** e galactose-triazol-3-O-galactose-OMe **3**, sendo os compostos **2** e **3** inéditos na literatura. Os compostos **1** a **3** deverão ser aplicados em ensaios biológicos direcionados a alterações cardiovasculares.

Referências

BARROSO, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. **Arq. Bras. Cardiol.**, [s.l.], v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>. Disponível em: <<https://abccardiol.org/article/diretrizes-brasileiras-de-hipertensao-arterial-2020/>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

CAMPO, V.L.; *et al.* Synthetic glycoconjugates inhibitors of tumor-related galectin-3: An update. **Glycoconj J**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 853-876, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9721-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-016-9721-z>. Acesso em: 10 mar. 2024.

RODRIGUES, D. M. *et al.* Novel synthetic derivatives of cinnamic and *p*-coumaric acids with antiproliferative effect on breast MCF-7 tumor cells. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 37, n. 24, p. 4210–4220, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2177992>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2023.2177992>. Acesso em: 10 mar. 2024.

MARCHIORI, M.F. *et al.* Binding of triazole-linked galactosyl arylsulfonamides to galectin-3 affects trypanosoma cruzi cell invasion. **Bioorg Med Chem**, [s.l.], v. 25, n. 21, p. 6049-6059, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968089617313664?via%3Dihub>. Acesso em: 9 mar. 2024.

MARCHIORI, M.F. *et al.* Synthetic 1,2,3-triazole-linked glycoconjugates bind with high affinity to human galectin-3. **Bioorg Med Chem**, [s.l.], v.23, n.13, p. 3414-3425, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.044>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089615003521?via%3Dihub>. Acesso em: 9 mar. 2024.

KOLB, H. C; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 8, n. 24, p. 1128-1137, dez. 2003. Elsevier BV. DOI:

[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02933-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02933-7).

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644603029337?via%3Dihub>. Acesso em: 23 fev. 2024.

SOEHNLEIN, O. ; LIBBY, P. Targeting inflammation in atherosclerosis — from experimental insights to the clinic. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 20, n. 8, p. 589–610, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1038/s41573-021-00198-1>.

Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41573-021-00198-1>. Acesso em: 26 jun. 2023.

VIOLA, J.; SOEHNLEIN, O. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. **Seminars in Immunology**, [s.l.],v. 27, n. 3, p. 184–193, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.013>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044532315000214?via%3Dihub>. Acesso em: 26 jun. 2023.

WU, S. C., Paul, A., *et al.* Generation and Use of Recombinant Galectins. **Current Protocols**, [s.l.], 1(3), e63. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpz1.63>.

Disponível em:

<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.63>. Acesso em: 26 jun. 2023.

YANG, R.Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, [s.l.], v. 10, 2008. DOI:

10.1017/S1462399408000719 . Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/journals/expert-reviews-in-molecular-medicine/article/abs/galectins-structure-function-and-therapeutic-potential/D64C5CA9B6A819D490F93C28BC3947EC>. Acesso em: 26 jun. 2023.