UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos
inibidores seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA)**

Michelle Ogava Igual

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MICHELLE OGAVA IGUAL

**Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores
seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA)**

Ribeirão Preto
2018

MICHELLE OGAVA IGUAL

**Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores
seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Michelle Ogava Igual

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 19/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Igual, Michelle Ogava

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA).
Ribeirão Preto, 2018.
190 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Carvalho, Ivone.

1. O-GlcNAcase. 2. OGA. 3. O-GlcNAcilação. 4. *Click Chemistry*. 5. Reações CuAAC.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelle Ogava Igual

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

IGUAL, MICHELLE O. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA)**. 2018. 190f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O-GlcNAcilação, ou modificação por O-GlcNAc, consiste na glicosilação de proteínas envolvidas em processos celulares fundamentais, e a sua desregulação tem sido associada a importantes doenças tais como diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer. A O-GlcNAcilação é regulada por duas enzimas: O-GlcNAc transferase (OGT) e O-GlcNAcase (OGA). Muitos inibidores da OGA descritos apresentam falta de seletividade entre a OGA e as isoenzimas Hex A e B lisossomais, o que pode ocasionar acúmulo de gangliosídeos no interior dos lisossomos e doenças neurodegenerativas. Desta forma, visando a obtenção de inibidores mais seletivos, foram propostos neste estudo a síntese e avaliação biológica de compostos derivados de *N*-acetilglicosamina, contendo na posição C-2 o anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído com diferentes cadeias laterais, na maioria contendo anéis aromáticos na sua extremidade, e a investigação da influência da extensão da cadeia entre os anéis na cavidade da OGA. Foram obtidos os derivados triazólicos **1**, **2** (no estudo anterior) e **8a-j** (no presente trabalho), em rendimentos bons a moderados, por meio da estratégia de *click chemistry*, envolvendo a reação de CuAAC entre o intermediário azido glicopiranosídeo **6**, e dez diferentes alcinos, dos quais cinco foram previamente sintetizados (**9 – 11**, **14** e **15**), e cinco disponíveis comercialmente. Para a síntese dos precursores acetilênicos **9 – 11**, **14** e **15** foram utilizadas diferentes estratégias sintéticas de acordo com cada alcino, como, por exemplo, reações de substituição nucleofílica e aminação redutiva. Os derivados triazólicos foram obtidos como mistura de anômeros β : α na proporção de 10:1, respectivamente. Devido à seletividade da enzima OGA apenas para substratos β , os compostos **8a-h** foram purificados por CLAE-DAD para separação das misturas. Posteriormente, foi possível realizar a cristalização do azido **6** em etanol, com consequente separação do anômero β deste intermediário, o que auxiliou na etapa sintética dos derivados **8i** e **8j** como anômeros puros. Os ensaios de MTT não evidenciaram citotoxicidade para os compostos, avaliados em 1,0 μ M. Os ensaios de *western blot* e enzimáticos dos derivados **1**, **2** e **8a-j** demonstraram que apenas os compostos **1**, **8i** e **8j** foram ativos para OGA, com valores de IC₅₀ de 0,49, 0,52 e 0,72 μ M, respectivamente. A partir deste resultado, foi possível sugerir que a extensão ideal da cadeia ligada entre os anéis triazólico e aromático é de dois carbonos (**1**), podendo acomodar um heteroátomo de nitrogênio (**8i**) ou oxigênio (**8j**). Ademais, os ensaios enzimáticos dos compostos **1**, **8i** e **8j**, avaliados para as Hex A e B, apresentaram IC₅₀ de 550, 569 e 571 μ M, respectivamente, sugerindo alta seletividade destes compostos para a OGA em detrimento das isoenzimas lisossomais. Com o trabalho desenvolvido em parceria com a Dra. Nuria E. Campillo (CSIC) foram planejados novos derivados não-carboidratos capazes de realizar interações com importantes resíduos do sítio catalítico da OGA e com potencial atividade biológica.

Palavras-chave: O-GlcNAcase, OGA, O-GlcNAcilação, *click chemistry*, reações CuAAC.

ABSTRACT

IGUAL, MICHELLE O. **Design, synthesis and biological evaluation of novel selective inhibitors of the hidrolase O-GlcNAcase (OGA)**. 2018. 190f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O-GlcNAcylation, or O-GlcNAc modification, consists of the glycosylation of proteins involved in fundamental cellular processes, and its deregulation has been linked to important diseases such as type 2 diabetes, neurodegenerative, cardiovascular diseases, and cancer. O-GlcNAcylation is regulated by two enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). Many OGA inhibitors described exhibit lack of selectivity between OGA and the lysosomal isoenzymes Hex A and B, which can result in the accumulation of gangliosides within the lysosomes and neurodegenerative diseases. Therefore, aiming to obtain more selective inhibitors, this study proposed the synthesis and biological evaluation of *N*-acetylglucosamine derivatives, containing at the C-2 position the 1,4-di-substituted 1,2,3-triazole ring bearing different side chains, most of them containing aromatic ring at their end, and the investigation of the side chain extension influence between the rings into OGA active site pocket. It was obtained the triazole derivatives **1**, **2** (in the previous study) and **8a-j** (in the current project) in good to moderate yield through the click chemistry strategy, involving the CuAAC reaction between azide glucopyranoside intermediate **6** and ten different alkynes, which five were previously synthesized (**9 – 11**, **14** and **15**), and five commercial available. For the synthesis of the acetylenic precursors **9 – 11**, **14** and **15** it was employed different synthetic strategies according to each alkyne, for example nucleophilic substitution reactions and reductive amination. The triazole derivatives were obtained as a mixture of β : α anomers in the proportion of 10:1, respectively. Due to the OGA selectivity to β substrates, compounds **8a-h** were purified by HPLC-DAD in order to separate the mixtures. Later in this study, it was possible to obtain the crystallization of azide **6** in ethanol, resulting in the separation of the β anomer from this precursor, which assisted in the synthetic step of the derivatives **8i** and **8j** as pure anomers. The MTT assays did not show cytotoxicity for the synthesized compounds, evaluated at 1.0 μ M. The western blot and the enzymatic assays, evaluated for compounds **1**, **2** and **8a-j**, demonstrated that only compounds **1**, **8i** e **8j** were active towards OGA, with IC_{50} values of 0.49, 0.52 e 0.72 μ M, respectively. From this result, it was possible to suggest that the ideal side chain extension linked between the triazole and aromatic rings is of two-carbon atoms (**1**), being able to accommodate one heteroatom of nitrogen (**8i**) or oxygen (**8j**). Furthermore, the enzymatic assays, evaluated for compounds **1**, **8i** e **8j** against Hex A and B, exhibited IC_{50} of 550, 569 e 571 μ M, respectively, suggesting a high selectivity of these compounds to OGA rather than the two lysosomal isoenzymes. In the project developed in partnership with Dra. Nuria E. Campillo (CSIC) it was designed new non-carbohydrates compounds capable of interacting with important residues of the OGA catalytic site with potential biological activity.

Keywords: O-GlcNAcase, OGA, O-GlcNAcylation, click chemistry, CuAAC reactions.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O-GlcNAcilação

Os carboidratos, além de apresentarem funções energética e estrutural, também participam de importantes processos celulares, tais como adesão e sinalização celular, quando conjugados com proteínas e lipídios, constituindo os chamados glicoconjugados.

A porção de açúcar dos glicoconjugados é denominada como glicana. Os diferentes tipos de glicanas são produzidos por meio de glicosilação, que pode ocorrer tanto dentro da via secretória celular, envolvendo o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, como fora desta via, ocorrendo no núcleo ou citoplasma da célula. A glicosilação de proteínas engloba *N*-glicanos, *O*-glicanas e glicosaminoglicanos (OHTSUBO; MARTH, 2006).

Um importante processo de *O*-glicosilação nucleocitoplasmático conhecido como *O*-GlcNAcilação tem merecido destaque pela sua participação na modificação pós-traducional de aproximadamente 4000 proteínas envolvidas em processos celulares fundamentais, dos quais podem ser citados, transcrição, sinalização celular, degradação de proteínas e estabilidade proteica (MA; HART, 2014; BOND; HANOVER, 2013). Além disso, a desregulação da via responsável pelo processo de *O*-GlcNAcilação tem sido associada ao desenvolvimento de doenças, como: diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (HART et al., 2007; BOND; HANOVER, 2013; BOND; HANOVER, 2015).

A *O*-GlcNAcilação, também conhecida por modificação por *O*-GlcNAc, foi primeiro descoberta por Torres e Hart em 1984, e consiste na ligação de uma única unidade do carboidrato β -*N*-acetilglicosamina (GlcNAc) em resíduos de serina e treonina de proteínas citoplasmáticas, nucleares e mitocondriais, via ligação *O*- β -glicosídica (TORRES; HART, 1984; YANG; QIAN, 2017).

O processo de *O*-GlcNAcilação é regulado diretamente pela atividade de duas enzimas: uma glicosiltransferase, denominada de *O*-GlcNAc transferase ou β -*N*-acetilglicosaminil transferase (OGT), que transfere moléculas de GlcNAc para as proteínas, a partir do substrato de uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), e uma hidrolase da classe das hexosaminidases, denominada de *O*-GlcNAcase ou β -*N*-acetilglicosaminidase (OGA), a qual catalisa a remoção dos resíduos de GlcNAc das proteínas (KIM, 2011).

A adição de resíduos de GlcNAc catalisada pela OGT é altamente sensível às concentrações celulares do seu substrato UDP-GlcNAc, o qual é dependente do fluxo de nutrientes, como a glicose, o aminoácido glutamina, acetil-CoA e uridina, através da Via de Biossíntese de Hexosamina (VBH) (**Figura 1**) (HARWOOD; HANOVER, 2014). A VBH tem início com a fosforilação da glicose pela enzima hexocinase, e posterior isomerização da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. A frutose-6-fosfato é, em seguida, metabolizada em glicosamina-6-fosfato pela enzima glutamina-frutose-6-fosfato-amidotransferase (GFAT) com a transferência de um grupo amino do aminoácido glutamina, sendo esta conversão a etapa limitante da via (MARSHALL et al., 1991). O grupo amino é, então, acetilado pela glicosamina-6-fosfato-*N*-acetiltransferase utilizando como doador acetil-CoA, formando *N*-acetil-glicosamina-6-fosfato. Após subseqüentes modificações, a enzima UDP-*N*-acetil-glicosamina pirofosforilase catalisa a transferência de um resíduo de uridina-5'-difosfato do doador UTP para formação do UDP-GlcNAc (**Figura 1**) (HARWOOD; HANOVER, 2014; LACZY et al., 2009).

Figura 1. Via de Biossíntese de Hexosamina (VBH). Processo de biossíntese do substrato UDP-GlcNAc a partir de importantes nutrientes celulares como glicose, glutamina, acetil-CoA e uridina. Adaptado de HARWOOD; HANOVER, 2014.

Glicosamina exógena também pode ser transportada para o interior celular, sendo fosforilada em glicosamina-6-fosfato, evitando a etapa lenta pela enzima GFAT, levando a um rápido aumento nos níveis de UDP-GlcNAc (LACZY et al., 2009). Como resultado da VBH, portanto, os níveis celulares do doador UDP-GlcNAc e, conseqüentemente, a extensão do processo de O-GlcNAcilação, são sensíveis às variações destes nutrientes do metabolismo celular (KIM, 2011).

Curiosamente, foi constatado que existe uma interação recíproca entre o processo de O-GlcNAcilação e de fosforilação, visto que ambos ocorrem em resíduos de serina e treonina das proteínas, e as modificações acontecem rapidamente em resposta a sinais celulares (ZEIDAN; HART, 2010; KIM, 2011; LIMA et al., 2011) (**Figura 2**). Esta dinâmica inter-relação entre O-GlcNAcilação e fosforilação pode ocorrer de forma competitiva, com ocupação de um único sítio de modificação ou sítios próximos, ou não-competitivamente, ocupando diferentes sítios em um substrato proteico (ZEIDAN; HART, 2010).

Figura 2. Relação recíproca entre O-GlcNAcilação e fosforilação em proteínas. Adaptado de YUZWA et al., 2008.

As mudanças na homeostase da VBH e a dinâmica relação entre O-GlcNAcilação e fosforilação das proteínas podem afetar inúmeras vias de sinalização celular (ZEIDAN; HART, 2010) contribuindo para a etiologia das doenças citadas anteriormente, como diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer. No item seguinte será apresentado, brevemente, como a desregulação da O-GlcNAcilação contribui para cada uma destas doenças.

1.1.1. Desregulação da O-GlcNAcilação e doenças crônico-degenerativas

Diversos estudos correlacionam o processo de O-GlcNAcilação com o desenvolvimento de diabetes tipo 2, uma vez que o aumento nos níveis de O-GlcNAc parece estar relacionado com a diminuição da secreção de insulina (AKIMOTO et al., 2007; SLAWSON; HART, 2003; ZACHARA et al., 2002). Quando as células são expostas a concentrações elevadas de glicose, ocorre o aumento nos níveis de UDP-GlcNAc, pelo aumento no fluxo da VBH e, por conseguinte, ocorre o aumento da O-GlcNAcilação de proteínas envolvidas na via sinalizadora de insulina, o que leva à apoptose das células beta do pâncreas e à glicotoxicidade (D'ALESSANDRIS et al., 2004; BOND; HANOVER, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que a O-GlcNAcilação reduz a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), o qual está relacionado com a diminuição da ativação da proteína cinase B (Akt) e a subsequente diminuição da absorção de glicose pelo transportador de glicose tipo 4 (WHELAN et al., 2010; BOND; HANOVER, 2013).

A relação entre O-GlcNAcilação e câncer ainda é pouco entendida. Estudos envolvendo câncer de mama demonstraram um declínio nos níveis de O-GlcNAc nas células tumorais associada a um aumento significativo da atividade da enzima OGA. Estas observações sugerem que, conforme a célula passa de normal à maligna, a regulação da O-GlcNAcilação é modificada, levando à diminuição dos níveis de O-GlcNAc e à multiplicação celular desordenada (SLAWSON et al., 2001). Por outro lado, Shi e colaboradores estudaram a relação da O-GlcNAcilação no desenvolvimento de Leucemia linfóide crônica (CLL) e observaram que o aumento da glicosilação das proteínas c-myc, p53 e Akt por O-GlcNAc, nas células de CLL, contribuíram para um melhor prognóstico da doença, sugerindo que a O-GlcNAcilação podem tornar as células menos sensíveis aos sinais de ativação em centros de proliferação (SHI et al., 2010).

O processo de O-GlcNAcilação também tem sido associado à regulação do sistema cardiovascular, visto que muitas proteínas que atuam diretamente no tônus vascular são alvos da O-GlcNAcilação (LIMA et al., 2011). Beleznai e Bagi, por exemplo, demonstraram que arteríolas de músculo esquelético, quando expostas a grandes concentrações de glicose, promovia a diminuição da vasodilatação devido ao aumento da O-GlcNAcilação da proteína óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) com consequente redução da sua fosforilação e atividade (BELEZNAI; BAGI, 2012;

WRIGHT et al., 2017). Estudos conduzidos pelo grupo de Tostes, em 2010, evidenciaram que o peptídeo endotelina 1 (ET-1) era capaz de induzir a vasoconstrição por aumentar os níveis de O-GlcNAcilação de proteínas sinalizadoras do controle vascular, possivelmente interferindo com o processo de fosforilação destas proteínas (LIMA et al., 2010).

A desregulação do processo de O-GlcNAcilação também está envolvida em doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson (WANI et al., 2016). Em neurônios afetados pelo Alzheimer, a proteína tau, necessária para promover a polimerização dos microtúbulos e estabilização dos neurônios, torna-se hiperfosforilada, o que, por sua vez, causa a sua agregação nos filamentos helicoidais emparelhados, constituindo os entrelaçamentos neurofibrilares característicos da doença (HART et al., 2007). No cérebro adulto saudável a proteína tau é extensamente O-GlcNAcilada, enquanto que, em pacientes com Alzheimer, a proteína tau hiperfosforilada apresenta notavelmente níveis reduzidos de O-GlcNAc, indicando a relação recíproca entre a O-GlcNAcilação e O-fosforilação (LIU et al., 2004; YUZZA et al., 2008). De maneira semelhante, uma das principais características da Doença de Parkinson é a presença de corpos de Lewis, os quais são formados pela agregação da proteína α -sinucleína. Estudos realizados por Marotta e colaboradores mostraram que a O-GlcNAcilação das proteínas α -sinucleínas podem afetar a sua fosforilação, diminuindo a formação de agregados, além de promover a redução da toxicidade (MAROTTA et al., 2015; WANI et al., 2016).

Em face destas observações da relação entre a O-GlcNAcilação e o comprometimento de doenças crônico-degenerativas, modulações nos níveis de O-GlcNAc por pequenas moléculas inibidoras da enzima O-GlcNAcase (OGA) representa uma estratégia útil não somente para o melhor entendimento dos mecanismos de O-GlcNAcilação (LI et al., 2011), como também para a aplicação no tratamento de doenças.

1.1.2. O-GlcNAcase (OGA)

Originalmente referida como Hexosaminidase C por Braidman e colaboradores, em 1974 (BRAIDMAN et al., 1974), e posteriormente purificada por Dong e Hart, em 1994 (DONG; HART, 1994), a enzima OGA é codificada pelo gene

MGEA5 (HECKEL et al., 1998) e pertencente à família da glicosil hidrolase 84 (GH84). Duas diferentes isoformas de OGA foram descritas. Uma variante longa, de 130-kDa, apresentando localização núcleo-citoplasmática, e uma isoforma curta, de 75-kDa sendo apenas localizada no núcleo (COMTESSE et al., 2001). A isoforma longa consiste de um domínio catalítico *N*-terminal, um domínio helicoidal, extensas regiões previstas como desordenadas, e um domínio C-terminal de função desconhecida semelhante aos domínios de histonas acetiltransferase (HAT); já a isoforma curta, menos ativa, não apresenta o domínio C-terminal (COMTESSE et al., 2001; ROTH et al., 2017).

Gao e colaboradores identificaram que a enzima OGA possui atividade ótima em pH neutro, apresentando ação catalítica para substratos de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), mas sem atividade para *N*-acetilgalactosamina (GalNac), sendo esta observação de extrema importância, visto que isto a diferencia das hexosaminidases lisossomais, conhecidas como β -hexosaminidase A (Hex A) e β -hexosaminidase (Hex B), as quais exibem atividade para GalNac em pH ácido (GAO et al., 2001; ALONSO et al., 2014).

O mecanismo de hidrólise da enzima OGA foi elucidado pelo grupo de Vocadlo e colaboradores, o qual envolve a catálise substrato-assistido com a formação de um anel intermediário de oxazolina (**Figura 3**) (MACAULEY et al., 2005). Dois resíduos de ácido aspártico da OGA humana, Asp174 e Asp175, foram identificados como essenciais para a atividade catalítica (ÇETINBAS et al., 2006). O mecanismo ocorre pelo ataque do oxigênio carbonílico do grupo 2-acetoamido ao carbono anomérico do anel piranosídeo, ocorrendo a liberação da porção aglicana, ligada à proteína, e formação de um intermediário bicíclico contendo o anel de oxazolina. A etapa de formação do intermediário de oxazolina é facilitada pela polarização do grupo 2-acetoamido pelo grupo carboxila do resíduo Asp174, atuando como base, enquanto a saída da porção aglicana é auxiliada pela catálise ácida do grupo carboxila do resíduo Asp175. Posteriormente, o mesmo resíduo Asp175 atua como base para facilitar o ataque de uma molécula de água no centro anomérico, rompendo o anel de oxazolina e liberando o hemiacetal de GlcNAc (ÇETINBAS et al., 2006; YUZZA et al., 2008; LI et al., 2011).

Figura 3. Mecanismo de hidrólise da enzima O-GlcNAcase (OGA). O mecanismo envolve a catálise substrato-assistida, via formação de um anel intermediário de oxazolina. Adaptado de ÇETINBAS et al., 2006.

1.1.3. Inibidores da O-GlcNAcase (OGA)

Muitos inibidores da OGA foram descritos até o momento. Dentre eles podem ser citados PUGNAc, Streptozotocin, NAG-tiazolina, NButGT, Thiamet-G, NAGstatina (MACAULEY; VOCADLO, 2010) e mais recentemente derivados de NAM-tiazolinas (KONG et al., 2016) e compostos híbridos de tioglicosil-naftalimida, designados de CAUS-A e CAUS-B (CHEN et al., 2018) (**Figura 4**).

Todavia, os questionamentos relacionados a estes pequenos compostos inibidores são devidos à falta de seletividade entre a OGA e as enzimas Hex A e B, visto que estas isoenzimas lisossomais participam criticamente da reciclagem de glicoesfingolipídeos e estudos mostraram que mutações ou inibição de ambas enzimas levam ao acúmulo de gangliosídeos no interior dos lisossomos, ocasionando as doenças neurodegenerativas conhecidas como Tay–Sachs e Sandhoff (MACAULEY; VOCADLO, 2010).

Figura 4. Exemplos de inibidores da enzima O-GlcNAcase (OGA).

Neste contexto, estudando os sítios catalíticos das hexosaminidases, Macauley e colaboradores observaram que a região do sítio ativo da OGA, a qual acomoda o grupo 2-acetoamido do substrato GlcNAc, seria mais flexível e mais tolerável a substituintes de maior volume, diferentemente das enzimas Hex A e B (**Figura 5**). Esta observação permitiria o desenvolvimento de novos inibidores mais volumosos e, portanto, mais seletivos para a OGA. Assim, Macauley e colaboradores estenderam a cadeia alquílica a partir do grupo metil do anel de tiazolina do composto NAG-tiazolina, com constante de inibição (K_i) de 80 nM, e sintetizaram o inibidor NButGT (**Figura 4**), obtendo maior seletividade (aproximadamente 600 vezes maior para OGA), ainda que com uma menor potência ($K_i = 600$ nM) (LI et al., 2011; MACAULEY et al., 2005). Posteriormente, obtiveram o composto Thiamet-G (**Figura 4**), derivado do NButGT, no qual um grupo metileno foi substituído por um grupo amina. Esta mudança favoreceu uma maior interação do Thiamet-G com a enzima OGA, obtendo K_i de 21 nM e seletividade 35 mil vezes maior (MACAULEY; VOCADLO, 2010).

Figura 5. Sítio ativo da enzima O-GlcNAcase (OGA). Representação do bolsão do sítio ativo da enzima OGA, complexado com o composto NAG-tiazolina, evidenciando a cavidade capaz de acomodar substituintes mais volumosos. Adaptado de MACAULEY; VOCADLO, 2010.

A presença do nitrogênio endocíclico do composto Thiamet-G, o qual se encontra ionizado em pH fisiológico, permite uma alta interação iônica com o resíduo de Asp242 (resíduo de aspartato da enzima OGA da *Bacteroides thetaiotaomicron*, correspondendo ao resíduo Asp174 da OGA humana), justificando a elevada inibição de OGA pelo composto Thiamet-G (YUZZA et al., 2008). Isto demonstra, como descrito anteriormente, a importância do resíduo de Asp242 para a atividade hidrolítica da enzima OGA, sendo um fator a ser explorado por novos inibidores seletivos para a OGA.

Os inibidores de OGA apresentados anteriormente possuem em comum a presença do anel de carboidrato. Entretanto, estudos de *screening* virtual, estrutura e cinética enzimática resultaram na identificação de novos inibidores não-glicosídicos, competitivos para a enzima OGA, podendo ser citado como exemplo, o composto *N*⁶-metiladenina, com IC₅₀ de 4 µM e 75 vezes mais seletivo para a OGA em relação às Hex A e B, e a Diprophillina, com atividade micromolar, sendo que apenas o isômero S apresenta maiores interações com no sítio ativo da OGA (**Figura 6A**) (DORFMUELLER et al., 2010). Compostos imino-açúcares baseados em anéis de pirrolidinas também mostraram atividade para a OGA, como observado

por Bergeron-Brlek e colaboradores, apresentando compostos com atividade de 9 nM para a enzima OGA (**Figura 6B**) (BERGERON-BRLEK et al., 2015).

Figura 6. Exemplos de inibidores não-glicosídicos para a enzima O-GlcNAcase (OGA). (A). Estruturas químicas dos compostos N⁶-metiladenina e Diprophillina. (B). Estrutura química do derivado imino-açúcar ativo para a enzima OGA.

1.2. “Click Chemistry”

A estratégia de *click chemistry* envolve um conjunto de reações rápidas, simples de serem realizadas e, quando necessário, com produtos facilmente purificados, e normalmente obtidos em alto rendimento. Este termo foi primeiro introduzido pelo grupo de Sharpless em 1999 e tem se tornado frequentemente citado em vários trabalhos da literatura (HEIN et al., 2008).

A reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por cobre Cu(I), entre azidos e alcinos terminais formando triazóis, é o exemplo principal de reações *click chemistry*. Azidos e alcinos, embora estejam entre as espécies de mais alta energia conhecida, são também os grupos funcionais menos reativos em química orgânica. Esta estabilidade é responsável pelo caráter lento das reações de cicloadição (KOLB; SHARPLESS, 2003).

A reação clássica de cicloadição de Huisgen, todavia, fornece anéis 1,2,3-triazólicos com uma mistura de regioisômeros 1,4 e 1,5-di-substituídos (**Figura 7A**). Assim, em estudos independentes, Meldal e Sharpless descreveram o uso de sais de Cu(I) como catalisadores das reações de cicloadição 1,3-dipolar produzindo apenas isômeros 1,4-di-substituído (**Figura 7B**) e foram designadas como: “Cicloadição Azido/Alcino Catalisadas por Cobre(I)” (CuAAC). Desta forma, a utilização de sais de Cu(I) acelerou consideravelmente as reações e, posteriormente, o uso de irradiação micro-ondas permitiu que as reações ocorressem em minutos ao invés de horas em temperatura ambiente (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010).

Figura 7. Reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. (A). Formação de regioisômeros 1,2,3-triazol 1,4 e 1,5-di-substituídos sob altas temperaturas. **(B).** Representação esquemática de reações de cicloadição azido/alcino catalisadas por cobre(I) (CuAAC). Adaptado de ARAGÃO-LEONETI et al., 2010.

A reação de CuAAC é especialmente relevante para a descoberta de novos fármacos pelas propriedades físico-químicas dos anéis triazólicos. Estes anéis servem como unidades rígidas que unem os carbonos ligados nas posições 1,4 do anel 1,2,3-triazol e os mantêm a uma distância de 5.0 Å (mimetizando amidas, as quais possuem o C- α a uma distância de 3.8 Å em relação ao carbono ligado ao nitrogênio da amida). Em contraste com amidas, o anel de triazol não pode ser hidrolisado e diferentemente de outros heterociclos aromáticos, é resistente a reações de oxidação e redução. O anel 1,2,3-triazol pode funcionar também como aceptores ou doadores de ligações de hidrogênio, dependendo da sua substituição. Nos anéis 1,2,3-triazóis 1,4-di-substituídos, os átomos de nitrogênio das posições 2 e 3 podem atuar como aceptores de ligação de hidrogênio, enquanto que o forte momento dipolar do anel triazólico polariza o hidrogênio ligado ao carbono da posição 5, podendo funcionar como um fraco doador de ligação de hidrogênio. Desta forma, a reação de CuAAC tem sido intensamente utilizada em pesquisas biomédicas desde a descoberta de novos candidatos e otimização de protótipos, como marcação em sistemas biológicos, como nucleotídeos e proteínas (KOLB; SHARPLESS, 2003; REDDY et al., 2010).

2. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a obtenção de doze derivados glicopiranosídeos inéditos (**1**, **2**, e **8a-j**), contendo o anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído ligado pela posição C-2 do anel carboidrato, via reações CuAAC. A rota sintética proposta forneceu em rendimento moderado o intermediário azido glicopiranosídeo **6** como uma mistura de anômeros β : α na proporção de 10:1, respectivamente. Adicionalmente, cinco precursores acetilênicos (**9** – **11**, **14** e **15**) também foram sintetizados em bons rendimentos a partir de diferentes estratégias sintéticas estabelecidas para cada alcino. A partir do azido **6**, na forma de mistura anomérica, e os derivados alcino sintetizados, ou obtidos comercialmente, a reação CuAAC foi conduzida com sucesso e os produtos finais **8a-h** foram isolados em bons rendimentos como mistura β e α .

A separação dos anômeros β dos derivados **8a-h**, com exceção do derivado **8f**, por CLAE-DAD, forneceu baixas quantidades dos compostos puros. Desta forma, foi avaliada a cristalização do precursor azido **6** em etanol, tendo sido possível obter apenas o anômero β deste intermediário, o que auxiliou na etapa sintética dos derivados **8i** e **8j** como anômeros puros.

Os ensaios de MTT não evidenciaram citotoxicidade para os compostos propostos, avaliados na concentração de 1,0 μ M. Os ensaios de *western blot* e enzimáticos dos derivados **1**, **2** e **8a-j**, avaliados em célula de músculo liso vascular de ratos Wistar, demonstraram que apenas os compostos **1**, **8i** e **8j** foram ativos para a enzima OGA, com valores de IC_{50} de 0,49, 0,52 e 0,72 μ M, respectivamente, o que foi possível sugerir que a extensão ideal da cadeia ligada ao anel triazólico seria de dois carbonos, podendo conter a presença ou ausência de heteroátomos. Os ensaios enzimáticos dos compostos **1**, **8i** e **8j** frente às β -hexosaminidases A e B apresentaram IC_{50} de 550, 569 e 571 μ M, respectivamente, sugerindo alta seletividade destes compostos para a enzima OGA, em detrimento das demais isoenzimas. Estes resultados foram muito satisfatórios, abrindo maior perspectiva para o melhor entendimento da estrutura-atividade e o desenvolvimento de futuros inibidores mais seletivos para a enzima OGA. Porém, ainda há a necessidade de realização de ensaios enzimáticos com enzima OGA isolada para a determinação do valor exato da concentração inibitória (50%).

Com o trabalho desenvolvido em parceria com a Dra. Nuria E. Campillo (CSIC) foram planejados novos derivados não-carboidratos capazes de realizar interações com importantes resíduos do sítio catalítico da OGA e com potencial

atividade biológica. No entanto, devido ao tempo determinado para realização do Mestrado, não foi possível realizar plenamente a síntese destes derivados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGID, A. F.; CARSON, K. G.; HARRIS, B. D.; MARYANOFF, C. A.; SHAH, R. D. Reductive Amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3849-3862, 1996.

ABIRAJ, K.; GOWDA, D. C. Magnesium-catalyzed proficient reduction of oximes to amines using ammonium formate. **Synthetic Communications**, v. 34, p. 599-605, 2004.

AKIMOTO, Y.; HART, G. W.; WELLS, L.; VOSSELLER, K.; YAMAMOTO, K.; MUNETOMO, E.; OHARA-IMAIZUMI, M.; NISHIWAKI, C.; NAGAMATSU, S.; HIRANO, H.; KAWAKAMI, H. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. **Glycobiology**, v. 17, p. 127-140, 2007.

ALONSO, J.; SCHIMPL, M.; VAN AALTEN, D. M. F. O-GlcNAcase: promiscuous hexosaminidase or key regulator of O-GlcNAc signaling? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 34433-34439, 2014.

ANSELME, J. P.; FISCHER, W. The reaction of anions of primary amines and hydrazones with *p*-toluenesulfonyl azide. **Tetrahedron**, v. 25, p. 855-859, 1969.

ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) "click chemistry" in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9475-9492, 2010.

BELEZNAI, T.; BAGI, Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. **Vascular Pharmacology**, v. 56, p. 115-121, 2012.

BERGERON-BRLEK, M.; GOODWIN-TINDALL, J.; CEKIC, N.; ROTH, C.; ZANDBERG, W. F.; SHAN, X.; VARGHESE, V.; CHAN, S.; DAVIES, G. J.; VOCADLO, D. J.; BRITTON, R. A Convenient approach to stereoisomeric iminocyclitols: generation of potent brain-permeable OGA inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, p. 15429-15433, 2015.

BILLING, J. F.; NILSSON, U. J. Cyclic peptides containing a δ -sugar amino acid – synthesis and evaluation as artificial receptors. **Tetrahedron**, v. 61, p. 863-874, 2004.

BOND, M. R.; HANOVER, J. A. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. **The Journal of Cell Biology**, v. 208, p. 869-880, 2015.

BOND, M. R.; HANOVER, J. A. O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, p. 205-229, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAIDMAN, I.; CARROLL, M.; DANCE, N.; ROBINSON, D.; POENARU, L.; WEBER, A.; DREYFUS, J. C.; OVERDIJK, B.; HOOGHWINKEL, G. J. Characterisation of human N-acetyl- β -hexosaminidase C. **FEBS Letters**, v. 41, p. 181-184, 1974.

BURNETTE, N. W. "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2412-2427, 2010.

ÇETINBAS, N.; MACAULEY, M. S.; STUBBS, K. A.; DRAPALA, R.; VOCADLO, D. J. Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human O-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. **Biochemistry**, v. 45, p. 3835-3844, 2006.

CHEN, W.; SHEN, S.; DONG, L.; ZHANG, J.; YANG, Q. Selective inhibition of β -N-acetylhexosaminidases by thioglycosyl-naphthalimide hybrid molecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 394-400, 2018.

CHIBBA, A.; POLOCZEK, J.; LITTLE, D. J.; HOWELL, P. L.; NITZ, M. Synthesis and evaluation of inhibitors of *E. coli* PgaB, a polysaccharide de-N-acetylase involved in biofilm formation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 7103-7107, 2012.

COMTESSE, N.; MALDENER, E.; MEESE, E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a β -N-Acetylglucosaminidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, p. 634-640, 2001.

CRUZ-GONZALEZ, D. Y.; GONZÁLEZ-OLVERA, R.; NEGRÓN-SILVA, G. E.; LOMAS-ROMERO, L.; GUTIÉRREZ-CARRILLO, A.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. E.; ROMERO-ROMO, M. A.; SANTILLAN, R.; URUCHURTU, J. One-pot three-component synthesis of new mono- and bis-1,2,3-triazole derivatives of 2-benzimidazoethiol with a promising inhibitory activity against acidic corrosion of steel. **Synthesis**, v. 46, p. 1217-1223, 2014.

D'ALESSANDRIS, C.; ANDREOZZI, F.; FEDERICI, M.; CARDELLINI, M.; BRUNETTI, A.; RANALLI, M.; DEL GUERRA, S.; LAURO, D.; DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; LAURO, R.; SESTI, G. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic β -cells. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 959-961, 2004.

DEMCHENKO, A. V. Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, 2008.

DÍEZ-GONZÁLEZ, S. Well-defined copper(I) complexes for click azide–alkyne cycloaddition reactions: one click beyond. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, p. 166-178, 2011.

DOLBIER JR, W. R. Guide to Fluorine NMR for Organic Chemists. **John Wiley & Sons, Inc**, 2. ed., 2016.

DONG, D. L.; HART, G. W. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 19321-19330, 1994.

DORFMUELLER, H. C.; VAN AALTEN, D. M. F. Screening-based discovery of drug-like O-GlcNAcase inhibitor scaffolds. **FEBS Letters**, v. 584, p. 694-700, 2010.

FARRAN, D.; SLAWIN, A. M. Z.; KIRSCH, P.; O'HAGAN, D. Diastereoselective synthesis of 2,3,4,5,6-pentafluoroheptanes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 7168-7171, 2009.

GAO, Y.; WELLS, L.; COMER, F. I.; PARKER, G. J.; HART, G. W. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from human brain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 9838-9845, 2001.

GÜNTHER, K.; SCHIPS, C.; ZIEGLER, T. Preparation of some glycosyl amino acid building blocks via click reaction and construction of a glycotetrapeptide library using spot synthesis. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 27, p. 446-463, 2008.

HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, p. 1017-1022, 2007.

HARWOOD, K. R.; HANOVER, J. A. Nutrient-driven O-GlcNAc cycling – think globally but act locally. **Journal of Cell Science**, v.127, p. 1857-1867, 2014.

HECKEL, D.; COMTESSE, N.; BRASS, N.; BLIN, N.; ZANG, K. D.; MEESE, E. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. **Human Molecular Genetics**, v. 7, p. 1859-1872, 1998.

HEIN, C. D.; LIU, X-M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2216-2230, 2008.

IRVINE, J. C.; MCNICOL, D.; HYND, A. New derivatives of D-Glucosamine. **Journal of the Chemical Society**, v. 11, p. 250-261, 1911.

JIN, L.; TOLENTINO, D. R.; MELAIMI, M.; BERTRAND, G. Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne "click reaction". **Science Advances**, v. 1, p. 1-5, 2015.

KALIKANDA, J.; LI, Z. Study of the stereoselectivity of 2-Azido-2-deoxygalactosyl donors: remote protecting group effects and temperature dependency. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 5207-5218, 2011.

KHANETSKYY, B.; DALLINGER, D.; KAPPE, C. O.; Combining Biginelli multicomponent and click chemistry: generation of 6-(1,2,3-Triazol-1-yl)-dihydropyrimidone libraries. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 6, p. 884-892, 2004.

KIM, E. J. Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc. **Molecules**, v. 16, p. 1987-2022, 2011.

KOLB, H. C.; FINN, M.G.; SHARPLESS, K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 40, p. 2004-2021, 2001.

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1128-1137, 2003.

KONG, H.; CHEN, W.; LIU, T.; LU, H.; YANG, Q.; DONG, Y.; LIANG, X.; JIN, S.; ZHANG, J. Synthesis of NAM-thiazoline derivatives as novel O-GlcNAcase inhibitors. **Carbohydrate Research** v.429, p.54-61, 2016.

KORB, O; BRINK, ten T; VICTOR PAUL RAJ, F. R. D; KEIL, M; EXNER, T. E. Are predefined decoy sets of ligand poses able to quantify scoring function accuracy? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 185-197, 2012.

KRYSIAK, J. M.; KREUZER, J.; MACHEROUX, P.; HERMETTER, A.; SIEBER, S. A.; BREINBAUER, R. Activity-based probes for studying the activity of flavin-dependent oxidases and for the protein target profiling of monoamine oxidase inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, p. 7035-7040, 2012.

LACZY, B.; HILL, B. G.; WANG, K.; PATERSON, A. J.; WHITE, C. R.; XING, D.; CHEN, Y-F.; DARLEY-USMAR, V.; OPARIL, S.; CHATHAM, J. C. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, p. H13-H28, 2009.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; CARNEIRO, F. S.; CARNEIRO, Z. N.; SALEH, M. A.; POLLOCK, D. M.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C.; ERGUL, A.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1. **Hypertension**, v. 55, p. 180-188, 2010.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; HARDY, D. M.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, p. R236-R250, 2011.

LI, T; GUO, L; ZHANG, Y; WANG, J; LI, Z; LIN, L; ZHANG, Z; LI, L; LIN, J; ZHAO, W; LI, J; WANG, P. G. Design and synthesis of O-GlcNAcase inhibitors via 'click chemistry' and biological evaluations. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 1083-1092, 2011.

LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; HART, G. W.; GONG, C-X. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 10804-0809, 2004.

MACAULEY, M. S; VOCADLO, D. J. Increasing O-GlcNAc levels: an overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800 p. 107-121, 2010.

MACAULEY, M. S.; WHITWORTH, G. E.; DEBOWSKI, A. W.; CHIN, D.; VOCADLO, D. J. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: Kinect analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 25313-25322, 2005.

MA, J.; HART, G. W. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. **Clinical Proteomics**, v. 11, p. 1-16, 2014.

MAJUMDAR, K. C; GANAI, S. An expedient approach to substituted triazolo[1,5-a][1,4]benzodiazepines via Cu-catalyzed tandem Ullmann C–N coupling/azide-alkyne cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 6192-6195, 2013.

MAROTTA, N. P.; LIN, Y. H.; LEWIS, Y. E.; AMBROSO, M. R.; ZARO, B. W.; ROTH, M. T.; ARNOLD, D. B.; LANGEN, R.; PRATT, M. R. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein α -synuclein associated with Parkinson's disease. **Nature Chemistry**, v. 7, p. 913-920, 2015.

MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 4706-4712, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NYFFELER, P. T.; LIANG, C. H.; KOELLER, K. M.; WONG, C. H. The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 10773-10778, 2002.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v.126, p. 855-867, 2006.

PANDIAKUMAR, A. K.; SARMA, S. P.; SAMUELSON, A. G. Mechanistic studies on the diazo transfer reaction. **Tetrahedron Letters**, v.55, p. 2917-2920, 2014.

RAO, H. S. P.; BHARATHI, B. Reduction of oximes with sodium borohydride – copper (II) sulfate in methanol. **Indian Journal of Chemistry**, v. 41, p. 1072-1074, 2002.

REDDY, L. V. R.; REDDY, P. V.; MISHRA, N. N.; SHUKLA, P. K.; YADAV, G.; SRIVASTAVA, R.; SHAW, A. K. Synthesis and biological evaluation of glycal-derived novel tetrahydrofuran 1,2,3-triazoles by 'click' chemistry. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1515-1521, 2010.

ROBLES-MACHÍN, R.; ADRIO, J.; CARRETERO, J. C. Gold-catalyzed synthesis of alkylidene 2-oxazolidinones and 1,3-oxazin-2-ones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 5023-5026, 2006.

RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the ligand-free Cu^I-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 2210-2215, 2005.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen Cycloaddition Process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 2596-2599, 2002.

ROTH, C.; CHAN, S.; OFFEN, W. A.; HEMSWORTH, G. R.; WILLEMS, L. I.; KING, D. T.; VARGHESE, V.; BRITTON, R.; VOCADLO, D. J.; DAVIES, G. J. Structural and functional insight into human O-glcNacase. **Nature Chemical Biology**, v. 13, p. 610-614, 2017.

SHAFI, R.; IYER, S. P. N.; ELLIES, L. G.; O'DONNELL, N.; MAREK, K. W.; CHUI, D.; HART, G. W.; MARTH, J. D. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 5735-5739, 2000.

SHI, Y.; TOMIC, J.; WEN, F.; SHAHA, S.; BAHLO, A.; HARRISON, R.; DENNIS, J. W.; WILLIAMS, R.; GROSS, B. J.; WALKER, S.; ZUCCOLO, J.; DEANS, J. P.; HART, G. W.; SPANE, D. E. Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 24, p. 1588-1598, 2010.

SLAWSON, C.; HART, G. W. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, p. 631-636, 2003.

SLAWSON, C.; PIDALA, J.; POTTER, R. Increased N-acetyl-L-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1537, p. 147-157, 2001.

STRAUB, B. F. μ -Acetylides and μ -alkenylidene ligands in "click" triazole syntheses. **Chemical Communications**, v. 0, p. 3868-3870, 2007.

TIWARI, V. K.; MISHRA, B. B.; MISHRA, K. B.; MISHRA, N.; SINGH, A. S.; CHEN, X. Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 3086-3240, 2016.

TORRES, C. R.; HART, G. W.J. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-Linked GlcNAc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 3308-3317, 1984.

TOWBIN, H.; STAHELINT, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 606-631, 2009.

VAN VRANKEN, D.; WEISS, G. Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology. **Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC**, 2013.

WANG, C.; IKHLEF, D.; KAHLAL, S.; SAILLARD, J-Y.; ASTRUC, D. Metal-catalyzed azide-alkyne "click" reactions: mechanistic overview and recent trends. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 316, p. 1-20, 2016.

WANG, Z.; WANG, C.; SUN, Y.; ZHANG, N.; LIU, Z.; LIU, J. A novel strategy to the synthesis of 4-anilinoquinazoline derivatives. **Tetrahedron**, v. 70, p. 906-913, 2014.

WANI, W. Y.; CHATHAM, J. C.; DARLEY-USMARA, V.; MCMAHON, L. L.; ZHANG, J. O-GlcNAcylation and neurodegeneration. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 80-87, 2016.

WHELAN, S. A.; DIAS, W. B.; THIRUNEELAKANTAPILLAI, L.; LANE, M. D.; HART, G. W. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 5204-5211, 2010.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **Science**, v. 340, p. 457-460, 2013.

WRIGHT, J. N.; COLLINS, H. E.; WENDE, A. R.; CHATHAM, J. C. O-GlcNAcylation and cardiovascular disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, p. 545-553, 2017.

YAMASAKI, T.; KUBOTA, Y.; TSUCHIYA, T.; UMEZAWA, S. Synthesis of 2-amino-2,3-dideoxy-L- and -D-Ribohexose by utilizing an O-N acetyl migration. **Bulletin of The Chemical Society of Japan**, v. 49, p. 3190-3192, 1976.

YANG, X.; QIAN, K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, p. 452-465, 2017.

YAN, R.-B.; YANG, F.; WU, Y.; ZHANG, L.-H.; YE, X.-S. An efficient and improved procedure for preparation of triflyl azide and application in catalytic diazotransfer reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 8993-8995, 2005.

YUZZA, S.; MACAULEY, M. S.; HEINONEN, J. E.; SHAN, X.; DENNIS, R. J.; HE, Y.; WHITWORTH, G. E.; STUBBS, K. A.; MCEACHERN, E. J.; DAVIES, G. J.; VOCADLO, D. J. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 483-490, 2008.

ZACHARA, N. E.; HART, G. W. The Emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 431-438, 2002.

ZEIDAN, Q.; HART, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 13-22, 2010.

ZHANG, W.; LI, Z.; ZHOU, M.; WU, F.; HOU, X.; LUO, H.; LIU, H.; HAN, X.; YAN, G.; DING, Z.; LI, R. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 799-807, 2014.