

**$\alpha$  E  $\beta$ -GLUCOSIDASES COMO ALVOS MOLECULARES PARA DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS****Eduardo Borges de Melo**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Colegiado de Farmácia, Rua Universitária, 2069, 85814-110 Cascavel - PR, Brasil

**Ivone Carvalho\***

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto - SP, Brasil

Recebido em 22/6/05; aceito em 19/9/05; publicado na web em 18/4/06

$\alpha$  AND  $\beta$ -GLUCOSIDASES AS MOLECULAR TARGETS FOR DRUG DEVELOPMENT. Glucosidases are involved in key steps in the processing of oligosaccharides by cleaving *O*-glucose residues. Since they catalyze breaking and transfer reactions of glucosidic groups for the normal growth and development of all the cells, defects or genetic deficiencies in these enzymes are associated with serious disorders of the carbohydrate metabolism. Thus, glucosidases represent important targets to develop inhibitors, owing to their potential activities against viruses, tumoral growth and metastasis, diabetes, Gaucher's disease and other syndromes associated with the lysosomal storage of glucoesphingolipids, and osteoarthritis. This paper presents a description of the biochemical pathways and mechanisms of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidases, and the currently available drugs capable to inhibit these enzymes.

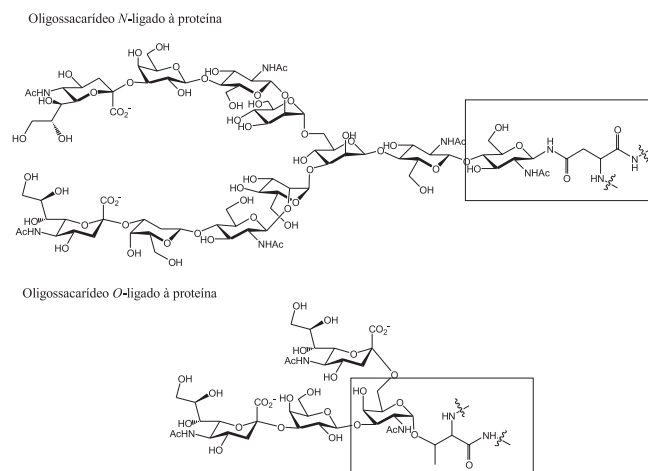
Keywords:  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidases; diabetes and Gaucher's diseases; HIV.

**INTRODUÇÃO**

As enzimas responsáveis pela clivagem e transferência de grupos glicosídicos conhecidas, respectivamente, como glicosidases e glicosiltransferases, são vitais para o crescimento normal e desenvolvimento das células e são amplamente distribuídas em mamíferos, plantas e microrganismos. Defeitos ou deficiências genéticas nestas enzimas estão associados a graves desordens do metabolismo de carboidratos, como diabetes e obesidade<sup>1</sup>. A família das glicosidases, em particular, participa de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, como processamento de oligossacarídeos provenientes da alimentação, tornando disponíveis unidades monossacarídicas de glucose para geração de glicogênio e glicoproteínas celulares, biossíntese e modificação de glicoesfingolípídios e catabolismo de peptidoglicanos e outros glicoconjugados. Adicionalmente, estas enzimas promovem alterações de paredes celulares bacterianas e vegetais e hidrólise de polissacarídeos estruturais altamente insolúveis, como quitina e celulose<sup>1</sup>.

As glicosidases estão, paralelamente, envolvidas no processamento de glicoproteínas e a região oligossacarídica destes glicoconjugados desempenha funções fundamentais nos processos biológicos, como resposta imune, reconhecimento intercelular (incluindo fertilização), diferenciação celular, enovelamento, estabilidade e solubilidade das proteínas, além dos processos patológicos, como câncer e inflamação. As reações de glicosilação em múltiplos sítios das proteínas geram enorme diversidade estrutural de glicoproteínas contendo uma ou até quarenta unidades monossacarídicas, conectadas entre si em diferentes posições do anel glicopiranosídeo. Sua estrutura varia de acordo com a espécie, órgão e célula, apresentando-se em diversas isoformas com unidades de açúcares que diferem quanto à natureza do resíduo, comprimento, ramificação e número de sítios de glicosilação da proteína. São classificadas em três categorias gerais: *N*-glicoproteína, representando uma unidade de açúcar ligada ao átomo de nitrogênio do aminoácido de asparagina; *O*-glicoproteína, ligado ao átomo de

oxigênio dos aminoácidos de serina ou treonina, representadas na Figura 1, e glicosofatidilinositol, envolvendo a derivatização do grupo carboxílico C-terminal<sup>2</sup>. A reação mais comum em eucariotes está relacionada à *N*-glicosilação de asparagina ligada a proteínas, catalisada pela enzima associada à membrana, oligossacarídeo-transferase (OT).

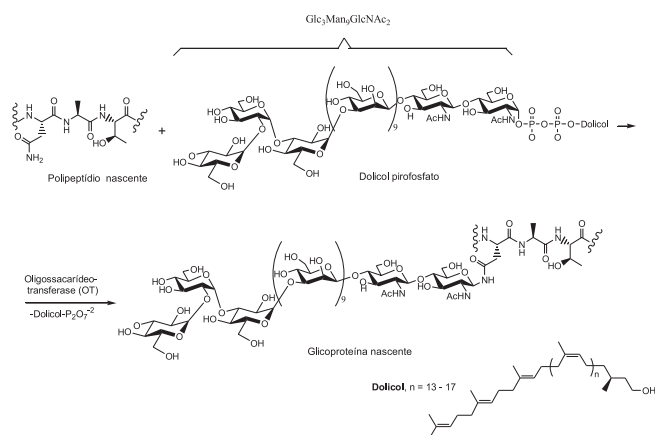


**Figura 1.** Exemplos de estruturas de glicoproteínas características contendo ligações *N*- ou *O*-glicosídicas. Adaptada da ref. 2

A transformação destas proteínas envolve a transferência co-translacional do sacarídeo presente no doador dolicol pirofosfato para a cadeia lateral de asparagina de uma proteína nascente, ilustrada na Figura 2. O oligossacarídeo comum em eucariotes apresenta estrutura ramificada ternária composta pelos açúcares  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , com exceção do protozoário tripanosomatídeo que transfere o sacarídeo  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , uma vez que não possui a enzima Dol-P-Glc sintase<sup>3</sup>.

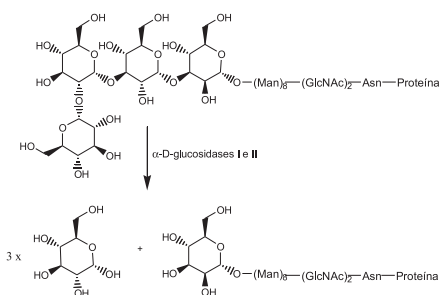
A diversificação subsequente do glicoconjugado, gerado pela ação da OT no lúmen da membrana do retículo endoplasmático

\*e-mail: carronal@usp.br



**Figura 2.** Reação de N-glicosilação de proteínas, catalisada pela enzima OT. Adaptada da ref. 2

(RE), ocorre a partir de uma série de reações de processamento pela ação conjunta de glicosilases e glicosiltransferases, presentes no RE e Complexo de Golgi. As  $\alpha$ -D-glucosidases I e II agem nas etapas iniciais do processamento do tetradeca-oligossacarídeo imaturo  $[Glc_3Man_9(GlcNAc)_2]$ , hidrolisando as ligações O-glicosídicas 1-2 e 1-3, respectivamente, liberando os três resíduos de glucose mais expostos da glicoproteína (Figura 3)<sup>4,5</sup>. O restante da cadeia sofre ação de  $\alpha$ -manosidases, seguido de alongamento por processos catalisados por glicosiltransferases e sulfotransferases, introduzindo resíduos de fucose, galactose, N-acetil-glicosamina, ácidos siálicos e sulfato<sup>6</sup>. A importância da hidrólise dos três resíduos de glucose pode ser evidenciada em processos de inibição de glucosidases I e II, onde ocorre diminuição significativa da secreção e estímulo da degradação de certas glicoproteínas, além de bloqueio da entrada destes glicoconjugados no caminho autofágico<sup>7</sup>.



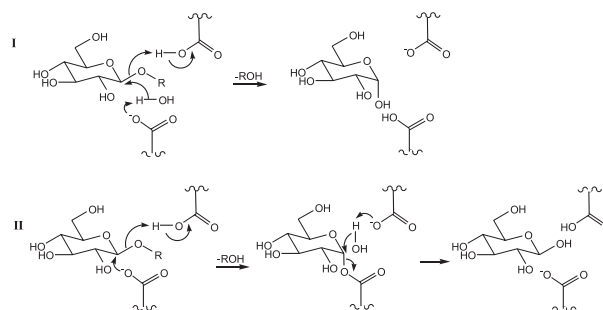
**Figura 3.** Processamento inicial da região oligossacarídica ( $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ ) de N-glicoproteína imatura pela ação das enzimas  $\alpha$ -D-glucosidases I e II. Adaptado das refs. 4 e 5

$\alpha$ -glucosidases são representadas pelas enzimas intestinais  $\alpha$ -amilase, trealose-6-fosfato hidrolase, sacarase e maltase, enquanto as  $\beta$ -glucosidases, pelas  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -D-acetil-hexosaminidase<sup>1</sup>.  $\alpha$ -glucosidases podem também ser denominadas de transglucosidases em razão das atividades hidrolítica e de transglucosilação, catalisando, respectivamente, dois tipos de reação, uma envolvendo a transferência de resíduo de D-glucose do lado não-redutor de oligossacarídeo para molécula de água (hidrólise) ou a transferência deste resíduo para uma unidade aceptora (transglucosilação). Nestas reações, D-glucose é liberada como anômero  $\alpha$ , retendo a configuração do substrato no carbono anomérico C-1 no produto de transglucosilação. Estas enzimas apresentam atividade em diversos substratos e podem ser subdivididas em forma ácida ou neutra, com pH ótimo variando de 4-5 ou 6-7, respectivamente<sup>8</sup>.

## MECANISMOS DE HIDRÓLISE

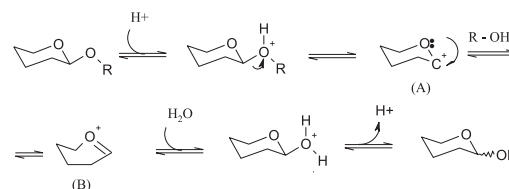
A clivagem da ligação glicosídica envolvendo  $\alpha$  ou  $\beta$ -glucosidases pode ocorrer por dois mecanismos principais  $S_N2$ , relacionada à substituição nucleofílica direta por molécula de água no carbono anomérico C-1 de glucose, com inversão de estereoquímica (I), menos comum, normalmente observada em glucoamilase, ou pelo mecanismo bimolecular de substituição com formação de intermediário covalente, que resulta em retenção de configuração (II), Figura 4. Somente enzimas que atuam com retenção de configuração apresentam atividade de transglucosilação, como demonstrado para diversas  $\alpha$ -glucosidases<sup>8</sup>.

No mecanismo I, um grupo carboxílico age como ácido e outro como base, diferentemente do mecanismo II, no qual um grupo de ácido carboxílico age como ácido e base e o outro, como nucleófilo. No entanto, algumas evidências têm sugerido a geração de íon no estado de transição, pelo mecanismo  $S_N1$ , com participação de ambos aminoácidos do sítio catalítico contendo grupos carboxílicos, com clivagem da ligação entre o carbono anomérico e o oxigênio glicosídico, gerando espécies positivamente carregadas, como carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B), Figura 5<sup>9,10</sup>. O estado de transição necessário para hidrólise da ligação glicosídica é caracterizado pela orientação pseudo-axial da ligação C-O a ser quebrada e conformação distorcida "skew"<sup>11</sup>.



**Figura 4.** Mecanismos I e II propostos para clivagem da ligação glicosídica pela ação de  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidases. Adaptado da ref. 8

Estudos de mutagênese de Glu-358 para Ala (E358A) envolvendo  $\beta$ -glucosidases que atuam pelo mecanismo II (*Agrobacterium faecalis*) na presença de grupo azido, como nucleófilo alternativo ao segundo grupo carboxilato, demonstraram que a reação pode fornecer o íon A. Adicionalmente, estudos envolvendo  $\alpha$ -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, na presença de fluoretos de 5-fluoroglicosídicos, relacionaram Asp214 como sendo o resíduo nucleofílico observado no mecanismo II<sup>9</sup>.



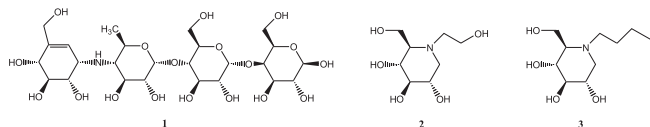
**Figura 5.** Formação de carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glucosidases. Adaptada das refs. 9 e 10

## FÁRMACOS DISPONÍVEIS NA TERAPÊUTICA

Inibidores de glucosidases são agentes de grande interesse terapêutico, uma vez que apresentam atividade contra vírus<sup>6,12</sup>,

crescimento tumoral e metástases, diabetes, doença de Gaucher e outras síndromes associadas ao armazenamento lisossomal de glicosíngolípídios<sup>13</sup> e osteoartrite<sup>12</sup>. São também descritos como inibidores da rejeição de órgãos transplantados<sup>14</sup>, agentes agroquímicos<sup>12</sup> e no tratamento da cárie dentária<sup>15</sup>.

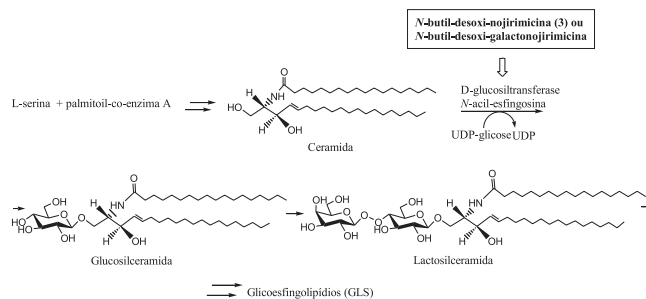
Os fármacos acarbose (**1**) (Precose<sup>®</sup>), miglitol (**2**) (Glyset<sup>®</sup>) e *N*-butil-1-desoxi-nojirimicina (**3**) (Zavesca<sup>®</sup>) são inibidores de glucosidases, disponíveis na terapêutica, sendo **1** e **2** indicados para tratamento de diabetes mellitus tipo II e **3**, para o controle da doença de Gaucher<sup>13,16-18</sup>. Na diabetes mellitus tipo II, mais comum em adultos e não dependente de insulina, a secreção de insulina pelo pâncreas pode ser normal, mas a entrada de glucose nas células é comprometida devido ao reduzido número de receptores para insulina, elevando os níveis de glucose sanguíneos. Adicionalmente, o fármaco **1** diminui as chances de pacientes com problemas de intolerância à glucose tornarem-se diabéticos e reduzem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ou problemas de pressão sanguínea<sup>19</sup>. A administração oral de 3,4,5-piperidinetriol **2**, antes das refeições, inibe  $\alpha$ -glucosidases (sacarase, maltase e glucoamilase) presentes no trato gastrointestinal, retardando a digestão de carboidratos e, conseqüentemente, promovendo melhor controle nas concentrações de glucose após as refeições. A associação de **2** com agente anti-hiperglicêmico da classe das sulfoniluréias pode ter efeito aditivo no tratamento da diabetes, uma vez que o mecanismo de ação deste último é distinto e relacionado ao aumento da secreção de insulina. O fármaco **2** (*N*-hidroxi-etil-1-desoxi-nojirimicina) apresenta maior absorção no trato gastrintestinal que **1** e foi introduzido no mercado em 1999, como o mais potente inibidor de  $\alpha$ -glucosidases de 2ª geração com efeitos colaterais reduzidos, normalmente relacionados à distensão abdominal, flatulência e diarreia<sup>19</sup>.



Por outro lado, o fármaco **3** é indicado para uso oral no tratamento da doença de Gaucher tipo I, relacionada a distúrbio genético do metabolismo de lipídio, mais especificamente envolvendo mutações em genes que codificam glicosil-hidrolases, como  $\beta$ -glucocerebrosidase, responsáveis pelo catabolismo de glicosíngolípídios (GSL) dentro dos lisossomos. O acúmulo de GSL, principalmente em macrófagos, promove disfunção celular e aumento do volume do fígado, baço e anormalidades na medula espinhal, causando neurodegeneração progressiva e morte ainda na infância. As estratégias usadas para tratamento desta doença têm sido aumentar a concentração da enzima que metaboliza GSL ou promover a privação de substratos essenciais para produção de GSL. Zavesca<sup>®</sup> representa uma nova abordagem para tratamento da doença de Gaucher, uma vez que diminui a formação de glucosilceramida, uma unidade importante na formação de GSL, pela inibição da enzima glucosilceramida sintase (D-glucosiltransferase). Adicionalmente, melhora a capacidade da enzima glucocerebrosidase em catabolisar GSL (Figura 6)<sup>13,20</sup>.

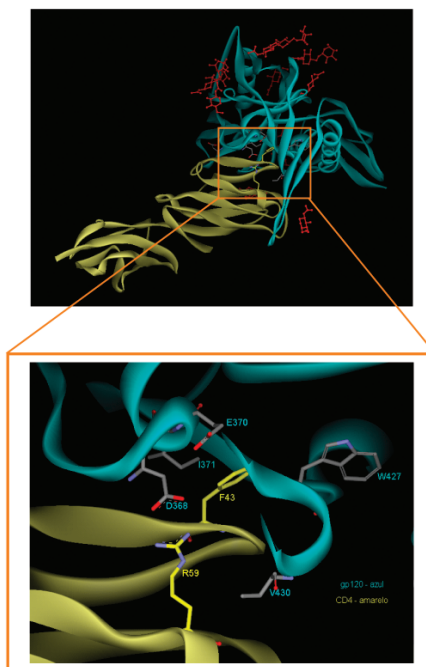
## PERSPECTIVAS NO TRATAMENTO DA AIDS

Inibidores de  $\alpha$ -glucosidases também têm sido estudados como potenciais agentes anti-HIV, com grande influência no ciclo de replicação viral<sup>21</sup>. A estrutura morfológica dos vírus HIV tipo 1 e 2 inclui proteínas estruturais e funcionais e um genoma de RNA protegidos por uma capa externa, conhecida como envelope viral. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica e contém uma



**Figura 6.** Biossíntese de glicosíngolípídios (GSL), sendo a primeira etapa inibida pelos imino-açúcares, *N*-butil desoxi-nojirimicina e *N*-butil-desoxi-galactonojirimicina, com a transferência de resíduo de glucose (como UDP-Glc) para ceramida (*N*-acil-esfingosina), catalisada pela enzima *D*-glucosiltransferase. Adaptada da ref. 13

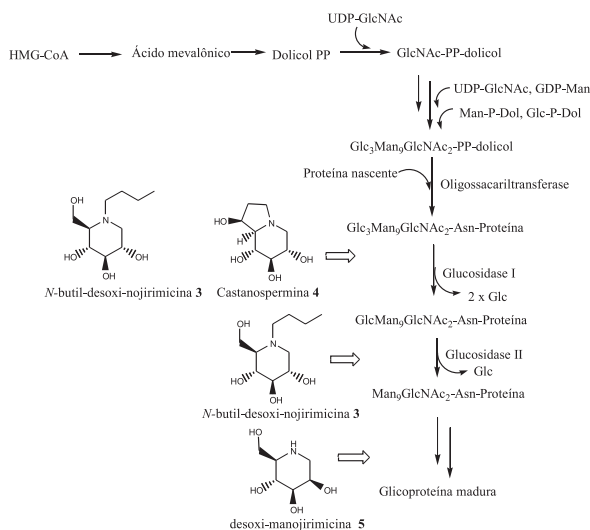
proteína complexa conhecida como *env*, que consiste das glicoproteínas gp41, transmembrana, e gp120, exposta à camada externa do envelope e ancorada à gp41<sup>22</sup>. Glucosidases I e II, envolvidas no processamento de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  da *N*-glicoproteína imatura (Figura 3) na célula, participam da formação de gp120, responsável pela interação do vírus com os receptores CD4 dos linfócitos T4 (receptor primário), etapa inicial fundamental no processo de infecção viral. Gp120 apresenta regiões variáveis e conservadas de forma extensivamente glicosiladas, representando verdadeiros alvos para ligação aos receptores primários e neutralização por anticorpos liberados no processo de infecção. A modulação da imunogenicidade e antigenicidade de gp120 é dependente da variabilidade e grau de glicosilação de sua superfície<sup>23</sup>. A estrutura cristalográfica do complexo ternário de interação gp120, parcialmente des-glicosilada, com receptores CD4 e anticorpos neutralizantes (omitidos na figura) é ilustrada na Figura 7<sup>24-26</sup>.



**Figura 7.** Estrutura cristalográfica do complexo gp120 (fitas azuis) e receptores CD4 (fitas amarelas), modelo des-glicosilado gerado no processo de reconhecimento e adesão do vírus ao linfócito T4. Figura montada no programa Accelrys Viewer Lite 4.2, PDB 1GCI, cujos anticorpos neutralizantes foram omitidos para melhor visualização. Adaptada da ref. 24

Os contatos entre gp120 e receptores CD4 são reduzidos, mas existe certa complementaridade estrutural evidenciada pelo potencial eletrostático das duas superfícies. Segundo estudos realizados por Kwong e colaboradores<sup>24</sup>, as interações mais importantes, mostradas na Figura 7, são realizadas por Phe43 e Arg59 de CD4 (amarelo) com múltiplos contatos com resíduos conservados, Asp368, Glu370 e Trp427 de gp120 (azul). Os maiores contatos de Phe43 são polares com os resíduos Asp368, Glu370, Asn425, Met426, Trp427 e Gly473, além de uma interação hidrofóbica com Ile371 de gp120. Por outro lado, Arg59 interage por dupla ligação de hidrogênio com Asp368 e Val430 da glicoproteína gp120. A cavidade de interface presente entre estas estruturas é normalmente preenchida por aminoácidos com razoável taxa de variação entre os tipos de vírus da imunodeficiência.

Substâncias inibidoras de glucosidases I e II, como *N*-butil-desoxi-nojirimicina (**3**) e castanospermina (**4**) possuem a capacidade de bloquear a atividade do vírus HIV *in vitro*, provavelmente por induzir a produção de gp120 imperfeitas que seriam incapazes de efetuar sua interação a membrana celular do linfócito T4 hospedeiro nos primeiros estágios da infecção<sup>27</sup>. Aparentemente, o tratamento de cultura de células com **3** não bloqueia a ligação de glicoproteínas do envelope à CD4, mas impede a fusão subsequente do vírus com a membrana celular<sup>28</sup>. A Figura 8 mostra as etapas do mecanismo de dolicol pirofosfato no processamento de glicoproteínas que são inibidas por **3**, **4** e desoxi-manojirimicina (**5**).



**Figura 8.** Biossíntese de *N*-glicoproteínas na célula, a partir de dolicol fosfato, e as respectivas etapas inibidas por derivados de carboidratos. Adaptada da ref. 2

Além das atividades delineadas acima, o inibidor **4** demonstrou efeitos imuno-moduladores na expressão, função e transdução de sinais de glicoproteínas envolvidas na fisiopatologia da encefalopatia autoimune experimental, usada como modelo de esclerose múltipla<sup>29</sup>. Por outro lado, o composto **3** promoveu a inibição do desenvolvimento da infecção causada pelo vírus da diarreia bovina (BVDV), modelo usado para o vírus da hepatite C (HCV). Nestes estudos, a combinação de **3** com interferon  $\alpha$ -2b promoveu potencialização da ação contra infecção por BVDV<sup>30</sup>.

## CONCLUSÕES

Frente ao exposto, existe considerável interesse na síntese e desenvolvimento de novos inibidores de glucosidases, visando o tratamento de infecções virais, câncer, patologias autoimunes, diabetes e outros distúrbios metabólicos, além da possibilidade de obtenção de modelos bioquímicos para estudo da estrutura e função de glicoproteínas<sup>31</sup>. Atenção especial tem sido dada àqueles que mimetizam a configuração dos grupamentos hidroxila das unidades expostas de glucose do oligossacarídeo  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -*N*-glicoproteína<sup>5</sup>.  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidases são alvos moleculares de enorme interesse terapêutico, graças à capacidade apresentada por alguns derivados de açúcar de inibir glucosidases intestinais, dando origem a novos agentes anti-diabéticos, diminuir a formação de glucosilceramida na doença de Gaucher e a capacidade *in vitro* documentada para inibição da replicação do vírus HIV, possibilitando o desenvolvimento de nova classe de fármacos para terapia anti-AIDS.

## REFERÊNCIAS

- Ganem, B.; *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 340; Murray, D. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.; *Harper: Bioquímica*, Atheneu: São Paulo, 1994.
- Ito, Y.; Matsuo, I. Em *Carbohydrate-based Drug Discovery*; Wong C.-H., ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003, vol. 1, cap. 9.
- Imperiali, B.; Tai, V. W. F. Em ref. 2, vol. 1, cap. 10.
- Schweden, J.; Borgmann, C.; Legler, G.; Bause, E.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *248*, 335.
- Carvalho, I.; Haines, A. H.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, *13*, 1795.
- Asano, N.; *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R.
- Durrant, C.; Moore, S. E. H.; *Biochem. J.* **2002**, *365*, 239.
- Krasikov, V. V.; Karelov, D. V.; Firsov, L. M.; *Biochemistry (Moscow)* **2001**, *66*, 332.
- Silverman, R. B.; *The Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press: San Diego, 2000.
- Melo, E. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.
- Heightman, T. D. and Vasella, A. T.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 750.
- Asano, N.; *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 669.
- <http://www.expertreviews.org/00001484h.htm>, acessada em Março 2005.
- Watson, A. A.; George, W. J.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J.; *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265.
- Fiehn, N. E.; Moe, D.; *Scand. J. Dent. Res.* **1983**, *91*, 175.
- Escola Nacional de Saúde Pública, Núcleo de Assistência Farmacêutica; *Fundamentos Farmacológicos-Clínicos dos Medicamentos de Uso Corrente*, ENSP: Rio de Janeiro, 2002.
- Hollander, P.; Pi-Sunyer, X.; Coniff, R. E.; *Diabetes Care* **1997**, *20*, 248.
- Kordik, C. P.; Reitz, A. B.; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 181.
- Cheng, A. Y. Y.; Josse, R. G.; *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* **2004**, 201.
- [http://www.zavesca.com/HP\\_SRT.html](http://www.zavesca.com/HP_SRT.html), acessada em Março 2005.
- Mitsuya, H.; Shirasaka, T.; Broder, S. Em *Design of Anti-AIDS Drugs*; De Clerq, E., ed.; Elsevier Press: Amsterdam, 1990, cap. 2.
- Challand, R.; Young, R. J.; *Antiviral Chemotherapy*, Spectrum Press: Oxford, 1997.
- Sharon, N.; Lis, H.; *Scientific American* **1993**, *1*, 74.
- Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Robinson, J.; Sweet, R. W.; Sodroski, J.; Hendrickson, W. A.; *Nature* **1998**, *393*, 648.
- Protein Data Bank 1GC1. <http://www.pdb.org>, acessada em Outubro 2003.
- Accelrys Inc<sup>®</sup>. *ViewerLite 4.2*. Washington, EUA, 2001.
- Gruters, R. A.; *Nature* **1987**, *330*, 74.
- Papandréou, M.; Barbouche, R.; Guieu, R.; Kieny, M. P.; Fenouillet, E.; *Mol. Pharm.* **2002**, *61*, 186.
- Walter, S.; Fassbender, K.; Gulbins, E.; Liu, Y.; Rieschel, M.; Herten, M.; Bertsch, T.; Engelhardt, B.; *J. Neuroimmunol.* **2002**, *132*, 1.
- Ouzounov, S.; Mehta, A.; Dwek, R. A.; Block, T. M.; Jordan, R.; *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 425.
- García-Moreno, M. I.; Díaz-Pérez, P.; Mellet, C. O.; Fernández, J. M. G.; *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8890.