

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 06/06/2025.

ALINE RENATA PAVAN

Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores (*PROteolysis TArgeting Chimera* – PROTAC) de histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme

Volume I

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos
Santos

Araraquara

2023

P337p Pavan, Aline Renata
Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores
(PROteolysis TArgeting Chimera – PROTAC) de histonas
deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme / Aline
Renata Pavan. -- Araraquara, 2023
655 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Anemia falciforme. 2. Hemoglobinopatia. 3. Epigenética. 4.
Síntese orgânica. 5. Hemoglobina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores (*PROteolysis TARgeting Chimera* – PROTAC) de histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme"

AUTORA: ALINE RENATA PAVAN

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Química, pela Comissão Examinadora:

Jean Leandro dos
Santos:29736821854

Assinado de forma digital por Jean
Leandro dos Santos:29736821854
Dados: 2023.06.12 09:06:00 -03'00'

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de
Araraquara da Unesp



Documento assinado digitalmente
CAROLINA LANARO
Data: 21/06/2023 11:56:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. CAROLINA LANARO (Participação Presencial)
Hemocentro da UNICAMP / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Documento assinado digitalmente
CHUNG MAN CHIN
Data: 19/06/2023 10:01:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de
Araraquara da Unesp

Profª. Drª. LILIAN SIBELLE CAMPOS BERNARDES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Lilian Sibelle Campos Bernardes
Data: 14/06/2023 10:58:50-0300
CPF: ***.487.066-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profª. Drª. DANIARA CRISTINA FERNANDES (Participação Presencial)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - IFSP - Matão



Documento assinado digitalmente
DANIARA CRISTINA FERNANDES
Data: 16/06/2023 19:47:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Araraquara, 06 de junho de 2023

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

A pesquisa desenvolvida e apresentada nesta tese apresenta impactos no âmbito científico, educacional e, a longo prazo, social e econômico. Durante o desenvolvimento do trabalho foram escritos e publicados em periódicos internacionais artigos científicos relacionados aos resultados obtidos e revisões bibliográficas sobre o tema, os quais fornecem à sociedade científica informações relevantes para consulta e direcionamento. Além disso, o estágio internacional realizado pela aluna proporcionou o aprendizado sobre uma nova classe de compostos, as *PROteolysis TArgeting Chimera* (PROTACs), que atualmente têm se mostrado como um tópico de grande procura dentro da área de Química Medicinal devido ao grande interesse acadêmico e de indústrias farmacêuticas. Com intuito de se divulgar o conhecimento adquirido, foram proferidos seminários sobre o tema dentro do grupo de pesquisa e em grupo de pesquisa parceiro no Hemocentro da UNICAMP, e têm-se como perspectiva a preparação e oferecimento para pós-graduação de uma disciplina sobre o tópico. Em relação ao impacto social, destaca-se a escassez de medicamentos existentes para tratamento da anemia falciforme e a não abrangência desses em relação, principalmente, aos pacientes residentes na África Subsaariana, os quais compreendem 70% dos pacientes acometidos com anemia falciforme. Sendo assim, a constante busca de novos compostos que possam ser úteis para o tratamento dessa doença e a publicação de dados referentes a esse trabalho contribuem para que futuramente se obtenha um novo medicamento que seja efetivo, e que garanta uma melhor qualidade de vida desses pacientes.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research developed and presented in this Thesis presents impacts in the scientific area, teaching and social area. During the development of this work, papers about the results obtained and reviews about the topic were written and published in international journals, providing the scientific community with relevant information for consultation and direction. Furthermore, the international fellowship provided the student with the knowledge of a new class of compounds, the PROteolysis TArgeting Chimera (PROTACs), which nowadays is an area of great relevance in the Medicinal Chemistry field due to the great interest of the pharmaceutical industry. Aiming to spread the knowledge, seminars were presented in our research group and also in a research group of a collaborator in the Hematology center at the UNICAMP. It is expected to offer a discipline about the topic to the post-graduate students. Regarding the social impact, it is important to highlight the lack of medicines for the treatment of sickle cell disease and the lack of coverage of these in relation to those who needs it the most. Therefore, the persistent search for new compounds that would be able to treat this disease and the publication of the data obtained in this work increase the possibility for the obtention of a new medicine in the future that is effective, safe and that contemplate all the people who need it.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: Aline Renata Pavan

Nome em citações bibliográficas: PAVAN, A. R.; PAVAN, ALINE; PAVAN, AR.; PAVAN, ALINE RENATA; RENATA PAVAN, ALINE.

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

UNESP – Campus de Araraquara

Rodovia Araraquara-Jaú Km 01 – s/n

Campos Ville

CEP 14800-903 – Araraquara-SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

2018 – 2023

Doutorado em Química.

Instituto de Química – UNESP Araraquara, IQ/Ar, Brasil.

Título: Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores (*PROteolysis TArgeting Chimera* – PROTAC) de histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2018/19523-7

2016 – 2018

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara, FCFAr, Brasil.

Título: Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados ftalimídicos inibidores de histona deacetilase para anemia falciforme.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2015/21252-3

2010 – 2015

Graduação em Farmácia – Bioquímica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara, FCFAr, Brasil.

Título: Síntese, caracterização e avaliação biológica de quelatos metálicos contendo ligantes de origem natural.

Orientador: Prof. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2012/15639-4.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

12/2021 – 11/2022

Doutorado Sanduíche

University of Leicester, Leicester, Reino Unido

Projeto: Synthesis and pharmacological evaluation of PROTAC-HDAC inhibitors-based compounds for Sickle Cell Disease

Supervisor: Prof. Dr. James T. Hodgkinson

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2021/10059-9

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA:

Artigos completos publicados em periódicos:

1. PAVAN, ALINE RENATA; LOPES, JULIANA ROMANO; LIMA IMPERADOR, CARLOS HENRIQUE; MAN CHIN, CHUNG; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Perspectives and challenges to discovering hemoglobin-inducing agents in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1, 2022.

2. URIAS, BEATRIZ SILVA; PAVAN, ALINE RENATA; ALBUQUERQUE, GABRIELA RIBEIRO; PROKOPCZYK, IGOR MUCCILO; ALVES, TÂNIA MARA FERREIRA; DE MELO, THAIS REGINA FERREIRA; SARTORI, GERALDO RODRIGUES; DA SILVA, JOÃO HERMÍNIO MARTINS; CHIN, CHUNG

MAN; SANTOS, JEAN LEANDRO DOS. Optimization of Resveratrol Used as a Scaffold to Design Histone Deacetylase (HDAC-1 and HDAC-2) Inhibitors. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1260, 2022.

3. TERRONI, BARBARA; MORAES, LUIS HENRIQUE OLIVEIRA DE; **PAVAN, ALINE RENATA**; RODRIGUES, GERSON JHONATAN; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO DOS. Vascular Effects of the Fetal Hemoglobin Inducer Agent 3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl) Benzyl Nitrate. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1311, 2022.

4. **PAVAN, ALINE RENATA**; LOPES, JULIANA ROMANO; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. The state of the art of fetal hemoglobin-inducing agents. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, p. 1279-1293, 2022.

5. LOURENÇO DE FREITAS, NATÁLIA; DEBERALDINI, MARIA GABRIELA; GOMES, DIANA; **PAVAN, ALINE RENATA**; SOUSA, ÂNGELA; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO; SOARES, CHRISTIANE P. Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1, 2021.

6. **PAVAN, ALINE RENATA**; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Advances in Sickle Cell Disease Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 2008-2032, 2021.

7. PRATES, JOÃO LUCAS BRUNO; **PAVAN, ALINE RENATA**; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Boron in Medicinal and Organic Chemistry. **Current Organic Chemistry**, v. 25, p. 1853-1867, 2021.

8. FERNANDES, GUILHERME FELIPE DOS SANTOS; CAMPOS, DÉBORA LEITE; CRISTIANE DA SILVA, ISABEL; BRUNO PRATES, JOÃO LUCAS; **PAVAN, ALINE RENATA**; PAVAN, FERNANDO ROGÉRIO; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Discovery of Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents Active Against Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis. **ChemMedChem**, v. 16, p. 1, 2021.

9. LONGHIN BOSQUESI, PRISCILA; CASTANHO BOLOGNESI MELCHIOR, AYLIME; **RENATA PAVAN, ALINE**; LANARO, CAROLINA; MARIA DE SOUZA, CRISTIANE; RUSINOVA, RADDIA; CONSOLIN CHELUCCI, RAFAEL; PEREIRA BARBIERI, KARINA; DOS SANTOS FERNANDES, GUILHERME FELIPE; ZEPONE CARLOS, IRACILDA; SPARRE ANDERSEN, OLAF; FERREIRA COSTA, FERNANDO; LEANDRO DOS SANTOS, JEAN. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, p. 103948, 2020.

10. DOS SANTOS FERNANDES, GUILHERME FELIPE; **PAVAN, ALINE RENATA**; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Heterocyclic N-oxides - A Promising Class of Agents Against Tuberculosis, Malaria and Neglected Tropical Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 1-16, 2018.

11. PAVAN, A. R.; FERNANDES, G. S. F.; SANTOS, J. L. Clinical Pharmacology: Epigenetic Drugs at a Glance. **Biochemistry & Pharmacology**: OPEN ACCESS, v. 7, p. 1, 2018.

12. FERNANDES, GUILHERME; SILVA, GABRIEL; **PAVAN, ALINE**; CHIBA, DIEGO; CHIN, CHUNG; DOS SANTOS, JEAN. Epigenetic Regulatory Mechanisms Induced by Resveratrol. **Nutrients**, v. 9, p. 1201, 2017.

13. PAVAN, ALINE; SILVA, GABRIEL; JORNADA, DANIELA; CHIBA, DIEGO; FERNANDES, GUILHERME; MAN CHIN, CHUNG; DOS SANTOS, JEAN. Unraveling the Anticancer Effect of Curcumin and Resveratrol. **Nutrients**, v. 8, p. 628, 2016.

14. ROSSETO, LEANDRO; PIRES, MARIA; MELCHIOR, AYLIME; BOSQUESI, PRISCILA; **PAVAN, ALINE**; MARCONDES, SISI; CHUNG, MAN; SANTOS, JEAN. Synthesis and Preliminary Evaluation of N-Oxide Derivatives for the Prevention of Atherothrombotic Events. **Molecules**, v. 20, p. 18185-18200, 2015.

15. MELCHIOR, A. C. B.; **PAVAN, A. R.**; BOSQUESI, PRISCILA; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Bromodomain as New Targets in Drug Discovery. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 4, p. 1000e176, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

1. PAVAN, A. R.; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Design, synthesis and enzymatic evaluation of HDAC 1 and HDAC2 selective inhibitors. *XXVII International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC)*, Nice, France, 2022.

2. PAVAN, A. R.; ALBUQUERQUE, GABRIELA RIBEIRO; URIAS, BEATRIZ SILVA; PROKOPCZYK, I. M.; Alves, T.; DE MELO, THAIS REGINA FERREIRA; SANTOS, J. L. Design, synthesis, and enzymatic evaluation of new HDAC 1 and 2 orto-aminobenzamides inhibitors. *GP2A Annual Conference*, Dublin, Ireland, 2022.

- 3. PAVAN, A. R.;** SANTOS, J. L. Estudo de Modelagem molecular de inibidores de histonas deacetilases da Classe I. *IX Congresso Científico da UNESP, Araraquara, Brasil, 2019.*
- 4. PAVAN, A. R.;** DELGADO, I. L. L. ; DUTRA, L. ; SCARIM, C. B. ; SALGADO, H. R. N. ; ALMEIDA, A. M. F. ; CARLOS, I. Z. ; SANTOS, J. L. . Avaliação do efeito antimicrobiano e antiinflamatório de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos como alternativa para o tratamento da acne vulgar. *IX Congresso Científico da UNESP, Araraquara, Brasil, 2019.*
- 5. PAVAN, A. R.;** CHELUCCI, R. C. ; LANARO, C. ; BARBIERI, K. P. ; BOSQUESI, PRISCILA ; CARLOS, I. Z. ; COSTA, F. F. ; SANTOS, J. L. . Analgesic activity and inhibition of neutrophil adhesion induced by resveratrol in sickle cell disease. *CONGRESO INTERNACIONAL RESVERATROL, Mendoza, Argentina, 2017.*
- 6. REIS, J. S.;** **PAVAN, A. R.;** FERREIRA, L. M. B.; CHIARI, B. G.; REIS JR, M. A.; ISAAC, V. L. B.; CORREA, M. A.; SANTOS, J. L. Synthesis, antioxidant and photoprotection of resveratrol derivatives useful to prevent skin cancer. *CONGRESO INTERNACIONAL RESVERATROL, Mendoza, Argentina, 2017.*
- 7. PAVAN, A. R.;** ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G. ; GRAMINHA, M.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Síntese e avaliação biológica de novas moléculas guanidínicas com potencial atividade anti-leishmania. *VI Congresso Farmacêutico da Unesp, Araraquara, Brasil, 2016.*
- 8. PAVAN, A. R.;** ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; GRAMINHA, M.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Synthesis and biological evaluation of novel guanidine derivatives as leishmanicidal compounds. *8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Armação dos búzios, Brasil, 2016.*
- 9. ALMEIDA, L.;** PASSALACQUA, T. G.; DUTRA, L.; **PAVAN, A. R.;** Martinez, I.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G.; THOMAS, A.; MAN CHIN, CHUNG; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. Potent in vivo leishmanicidal activity of N-oxide derivatives. *8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Armação dos búzios, Brasil, 2016.*
- 10. PAVAN, A. R.;** ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; GRAMINHA, M.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Síntese e avaliação biológica de novos derivados furoxânicos com potencial atividade anti-leishmania. *II Simpósio de Química Medicinal – “Inovação e Empreendedorismo em Fármacos”, São José do Rio Preto, Brasil, 2016.*

- 11. PAVAN, A. R.;** MELCHIOR, A. C. B.; FERNANDES, G.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Obtenção de insaturações partindo-se de grupamentos aldeídicos. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 12. DUTRA, L.;** **PAVAN, A. R.;** MELCHIOR, A. C. B.; FERNANDES, G.; PIRES, M.; SANTOS, J. L. Síntese, caracterização e avaliação farmacológica de novos compostos para tratamento e prevenção de aterotrombose. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 13. Yamasaki, P. R.;** **PAVAN, A. R.;** MELCHIOR, A. C. B.; NASCIMENTO, D.; CHELUCCI, R.; PLACERES, M.; CARLOS, I. Z.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Preparation and evaluation of dapsone-thalidomide hybrids for the treatment of type 2 leprosy reactions. *7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry*, Campos do Jordão, Brasil, 2014.
- 14. PAVAN, A. R.;** FERNANDES, G.; SANTOS, J. L. Síntese de novos candidatos a fármacos úteis para o tratamento de tuberculose. *Congresso de Iniciação Científica da Unesp*, Águas de Lindoia, 2014.
- 15. FERNANDES, G. S. F.;** MARINO, L. B.; SOUZA, P. C.; MELCHIOR, A. C. B.; **PAVAN, A. R.;** SANTOS, J. L. Avaliação antiMycobacterium tuberculosis de derivados furoxânicos. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 16. FERNANDES, G. S. F.;** MARINO, L. B.; SOUZA, P. C.; MELCHIOR, A. C. B.; **PAVAN, A. R.;** CHIN, C. M.; PAVAN, F. R.; SANTOS, J. L. Avaliação antiMycobacterium tuberculosis de derivados N-acil hidrazônicos. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 17. MELCHIOR, A. C. B.;** PIRES, M. E. L. LANARO, C.; **PAVAN, A. R.;** COSTA, F. F.; CHUNG, M. C.; CARLOS, I. Z.; PLACERES, M.; SANTOS, J. L. Avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos úteis ao tratamento dos sintomas da anemia falciforme. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.

PARTICIPAÇÕES EM BANCAS:

Trabalho de Conclusão de Curso:

1. PAVAN, ALINE RENATA; BONJORNO, A. F.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Beatriz Meduqui Rodrigues. Modelagem molecular e síntese de novos agentes reversores de latência dos reservatórios do vírus HIV. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. PAVAN, ALINE RENATA; PRATES, J. L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Andressa Francielli Bonjorno. Síntese de novos derivados nitroimidazooxazina planejados para o tratamento da tuberculose. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

3. PAVAN, A. R.; PRATES, J. L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Felipe Eduardo Bazilio. Tecnologias e suas aplicações na promoção do uso racional de medicamentos: uma revisão bibliográfica. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4. PAVAN, A. R.; PRATES, J. L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Max Gerlack. Síntese de inibidores duais como agentes reversores de latência para HIV. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

5. PROKOPCZYK, I. M.; **PAVAN, A. R.;** SANTOS, J. L. Participação em banca de Johnny Wallef Leite Martins. Síntese de derivados de quinoxalinas 1,4-di-N-óxidos planejados contra leishmaniose. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

6. PAVAN, A. R.; SOUZA, L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Carolina Bozza Matheus. Atenção farmacêutica em pacientes com problemas renais. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

7. PAVAN, A. R.; CHIBA, D. E.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Gabriela Ribeiro Albuquerque. Síntese de derivados 2-aminobenzamídicos planejados como indutores de hemoglobina fetal. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

8. PAVAN, A. R.; DOS SANTOS FERNANDES, GUILHERME FELIPE; SANTOS, J. L. Participação em banca de Andressa Mayumi Ocubaro. O efeito placebo e suas implicações na medicina alternativa e complementar. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SUPERVISÃO CIENTÍFICA:

Trabalho de Conclusão de Curso:

1. Aluna: Ana Clara Scomparin

Título: Estudo de modelagem molecular e síntese de derivados borônicos inibidores de histona deacetilase.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2022

Bolsa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan.

2. Aluna: Raquel dos Santos Rauber

Título: Síntese de derivados do voxelotor como agentes ligantes covalentes irreversíveis de hemoglobina

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2022

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan.

3. Aluna: Beatriz Silva Urias.

Título: Síntese de inibidores seletivos HDAC 1 e 2 para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2020

Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan

4. Aluno: Mateus Greco de Oliveira

Título: Síntese de novos derivados da pomalidomida doadores de óxido nítrico para tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2019

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan

Dedico esta Tese à minha família por terem me dado todo o amor e carinho, por sempre estarem ao meu lado para superar todos os problemas e dificuldades, e sem a qual este trabalho não existiria.

Dedico esta Tese aos amigos que estiveram comigo, perto ou longe, e que foram minha base no dia a dia.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos com as pessoas mais importantes e essenciais da minha vida: Nadir e Nelson. Mãe e Pai, por muitas vezes já lhes disse isso, mas dessa vez vai ficar registrado...sem vocês, nada deste trabalho existiria. Vocês foram meus maiores incentivadores desde que eu saí de casa. Todas as vezes que busquei ajuda vocês estavam ali para me dar suporte e me ajudar a continuar caminhando. Houve situações em que me vi sem saída, e foram vocês que souberam me guiar e me iluminar. Toda a luta que vocês sempre travaram durante toda a vida resultou em tudo que vocês têm hoje, e em tudo que vocês plantaram em mim e nos meus irmãos. Se hoje podemos colher sucesso, é porque vocês plantaram uma sementinha e nos ajudaram a regar. Obrigada por tudo que sempre fizeram e por tudo que fazem por mim. Essa conquista é de vocês também! Amo vocês.

Paulo e Monica, o significado de vocês na minha vida é de força e proteção. Durante esses últimos cinco anos eu posso dizer que tive uma equipe me dando suporte, e cada um com um papel diferente. O de vocês foi o de me manter forte e de me sentir protegida. Paulo, por ser meu irmão mais velho e por sua personalidade forte sempre me senti segura ao seu lado, mas esses últimos anos me fizeram entender que mesmo crescendo, mesmo indo morar do outro lado do mundo, vou ter meu “tato” comigo para sempre. Com você aprendi que o que nos move na vida é a perseverança e coragem, e levo isso comigo em tudo que faço. Monica, ainda não consigo encontrar o ponto em que nossa história começou, porque a sensação é que você sempre esteve ali. Seus puxões de orelha e conselhos assertivos sempre me fizeram olhar as coisas de uma forma diferente, e me ajudaram a escolher meus caminhos. Obrigado por tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Essa conquista é de vocês também! Amo vocês.

Fer e Andreia, meus conselheiros da vida acadêmica (e da vida). Por muitas vezes recorri a vocês com dúvidas, inseguranças e medos e sempre recebi em troca apoio e encorajamento. Olho para vocês como exemplos da profissional que quero um dia ser. Fer, você me deu suporte e abrigo quando eu mais precisei, e isso nunca será esquecido. Todo o apoio e conselhos que vieram de você me ajudaram a tomar decisões importantes e me ajudaram a construir quem eu sou hoje. Andreia, junto com o Fer você me acolheu e me deu suporte. Nossas conversas sempre me fazem

olhar a vida com outros olhos e me ajudam a me entender como ser humano. Todas as trocas de experiências que tivemos me deram base para buscar ajuda e construir tijolinho por tijolinho a Aline que quero ser. Obrigado por tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Essa conquista é de vocês também! Amo vocês.

Ga, Valen e Soso...meus amorzinhos. Agradeço a honra de ser tia de vocês. O nascimento de vocês abriu um espaço no meu coração que eu nem sabia que existia, e me fez entender o que é o amor incondicional. Obrigada por existirem, amo vocês demais!

Chibiiiiinha! Dizem que depois de 7 anos de amizade as pessoas não se separam mais...Estamos completando 10 anos, ou seja, você não se livra mais de mim! Chiba, obrigada por ser esse companheiro para tudo. Agradeço todos os conselhos (acadêmicos ou não), por todas as conversas, por todas as ajudas, por todos os almoços e as idas à barzinhos. Sua calma e habilidade de ser uma pessoa centrada sempre me inspiraram. Obrigada por tudo, Chibinha, amo você!

João, você chegou no lab todo quietinho, mas mal sabíamos o furacão de alegria que seria liberado em pouco tempo. Migo, obrigada por ser esse amigo de todas as horas e para todas as ocasiões. Obrigada por todas as vezes que me escutou, que me ajudou e que esteve do meu lado. Obrigada por todas as brejas que tomamos juntos. Nos conhecemos dentro do lab, mas você é um amigo para a vida. Agradeço por ter você em meu caminho, migo, amo você!

Juliana (Juuuu)... eu lembro da primeira vez que te vi numa defesa de doutorado do lab, toda quietinha e longe da gente e ninguém sabia quem era você. Aí corta para hoje...você se tornou uma das pessoas que a gente não quer mais que saia do lab. Ju, você tem uma das características que eu mais admiro em uma pessoa, que é a sinceridade. Todas as vezes que preciso de uma opinião sincera e honesta é para você que eu recorro. Você é uma amiga para a vida e agradeço demais ter encontrado você e ter tido a chance de trabalhar com alguém tão competente, determinada e parceira. Obrigada por tudo, Ju, amo você!

Agradeço à Beatriz Urias, Mateus Greco, Ana Scomparin e Raquel Rauber pela honra de estar ao lado de vocês como co-orientadora. Vocês me deram a oportunidade de aprender mais sobre a docência e me ajudaram a crescer como profissional e ser humano.

Agradeço a todos os amigos do Lapdesf: Andressa, Ana, Any, Bianca, Diogo, Fernanda, Felipe, Guilherme, Gustavo, Igor, Livia, Maria, Maiara, Mateus, Pamela e Thuany pelo tempo que sempre passamos juntos.

Joshua (Josh)...you were by my side since day one at Uni, and I could not even imagine how important you would be to me during my year in Leicester and after that. You are one of the most lovely and thoughtful human beings I've ever known. Thank you for introducing me the Tinybakery, Mr. Whippy, and all the other food and drinks we had together. Thank you for being so kind to me. If you need anything from me, at any time, I'll be here for you. Love you and miss you (and your songs) every day!

Wiktoría (Wik)...one of my biggest fears when travelling abroad was about not being able to find a friend that I could talk about everything (good/bad/weird stuff) without being worried about anything....and then I met you. Thank you for all our talks about chemistry, food in Brazil and Poland, Tv shows, life, kinder chocolate... You always made my days happy, and I hope to see you soon again. Love you and miss you!

Urvashi...we worked together for only a few months, but I feel that I know you for way longer. Thank you for being such a lovely and supportive friend! You are the kind of person that is a pleasure to work with and to be able to call a friend. I hope to see you soon! One more Portuguese word for you: amigo/amiga = friend. Love you and miss you!

Meg...you were always the person that was in the lab to help me with everything. As I said once, I would love to have a "Meg" in Brazil, because life would be so much easier. When I first met you, I saw you as a serious person...after a while I realized that you were really a serious person, but with a lovely and warm heart. Thank you for the time we spent together. Love you and miss you!

Camila...Calinda, obrigada por sempre, mesmo de longe, se fazer perto. Obrigada por ser a amiga que topa tudo e que faz de tudo para nos fazer bem. Obrigada por todos os momentos que vivemos juntas e por tudo que ainda viveremos. Te amo e sinto muita saudade de você!!

Thais...Vods, saudades do seu abraço de urso e de tomar umas boas caipirinhas enquanto fofocamos. Sinto muita falta de ter você aqui pertinho. Te amo e estou com saudades.

Fernanda...Felinda, você sempre me incentivou muito e me direcionou palavras de carinho e apoio. Poder ter você como amiga me deixa feliz e honrada, pois tenho muito orgulho de você! Ainda precisamos marcar nosso mochilão! Te amo e estou com saudades.

Agradeço à Patrícia Bento por me apresentar a vida acadêmica e por sempre me inspirar. Paty, você ajudou nos meus primeiros passos dentro de um laboratório de pesquisa e estive do meu lado desde então. Obrigada por ser essa pessoa excepcional e por ser um dos melhores exemplos que eu poderia ter. Amo você.

Agradeço à Carol Lanaro pela realização dos ensaios de indução de γ -globina, por ter me recebido tão bem no laboratório e se mostrado uma pessoa sensacional. Agradeço também ao prof. Dr. Fernando Ferreira Costa por me receber em seu laboratório e autorizar a realização dos ensaios.

Agradeço aos meus orientadores Jean e James:

James, thank you for having me in your lab, for trusting me and for giving me the opportunity to develop such a beautiful work with you. Thank you for all the coffees and the talks that we had together. The time I spent in your lab was essential for me to grow as a professional and human being.

Jean...trabalhamos juntos há 10 anos e ainda não tenho palavras suficientes para agradecer tudo que fez por mim. Você é um dos meus exemplos dentro da área acadêmica, e sempre foi uma inspiração. Agradeço a liberdade que você sempre me deu dentro do laboratório e por confiar no meu trabalho e potencial. Todos esses anos você me ajudou a crescer e entender o papel que temos dentro e fora da universidade. Obrigada por ter sido a minha base dentro da área acadêmica. Obrigada por todas as vezes que me incentivou a ir além e a alcançar voos cada vez mais altos. Tenho orgulho e me sinto lisonjeada de ter você como orientador. Obrigada por tudo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço à FAPESP pela concessão das bolsas no país e no exterior, às quais possibilitaram a execução do trabalho (Processos FAPESP nº 2018/19523-7 e 2021/10059-9)

“If we want to achieve our goal, then let us empower ourselves with the weapon of knowledge
and let us shield ourselves with unity and togetherness.”

(Malala Yousafzai: 16th birthday speech at the United Nations, 2013)

“One child, one teacher, one book and one pen can change the world.”

(Malala Yousafzai)

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia causada por uma mutação pontual no gene da β -globina. Essa mutação resulta na formação de uma hemoglobina mutada (HbS) que polimeriza e causa mudanças irreversíveis na morfologia das hemácias, a qual adquire a forma de foice e é responsável pela fisiopatologia da doença. Dentre as estratégias descritas para tratamento da AF está a indução de expressão de γ -globina e produção de hemoglobina fetal (HbF), a qual é capaz de diminuir os sintomas da doença por reduzir as taxas de polimerização, dentre outros efeitos, e foi a estratégia selecionada para o presente trabalho. As enzimas epigenéticas histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 foram os alvos explorados para desenvolvimento de novos indutores de expressão de γ -globina e produção de HbF. Sendo assim, este trabalho foi dividido em duas partes: 1) Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos inibidores de HDAC 1 e 2; 2) Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novas PROTACs para degradação de HDAC 1 e 2. Na primeira parte foram sintetizados 24 intermediários e 7 produtos finais inéditos com rendimentos que variaram entre 29 e 85%. Os dois compostos mais promissores ((**21**) e (**31**)) apresentaram valores de IC_{50} variando entre 17 e 950 nM e importante seletividade contra as HDACs 1 e 2. Em um ensaio preliminar utilizando-se células eritroleucêmicas (K562) ambos os compostos foram capazes de aumentar em, aproximadamente, 7x a expressão de gama-globina a 1 μ M após o tempo de tratamento de 72h e 96 h sendo superior ao fármaco utilizado na terapia, a hidroxiureia. Na segunda parte, 40 intermediários e 13 moléculas inéditas foram sintetizadas com rendimentos que variaram entre 30 e 65%. Todos os compostos foram avaliados quanto a degradação das HDACs 1-3 e, de forma geral, os compostos apresentaram degradação seletiva contra HDAC-1. Destacam-se os compostos **ARP-26**, **ARP-37** e **ARP-49**, com valores de degradação que variaram de 41 a 60% contra HDAC-1. Os valores de DC_{50} dos compostos **ARP-26** e **ARP-49** foram determinados, e apresentaram aproximadamente 50% de degradação à 2,5 μ M. Sendo assim, foi possível sintetizar e obter novos inibidores de HDAC seletivos contra HDAC-1 e HDAC-2 e capazes de induzir a expressão de γ -globina a níveis acima do que o fármaco atualmente no mercado e que podem ser úteis como candidatos à fármacos para o tratamento da anemia falciforme. Foi possível também sintetizar e obter PROTACs inéditas com seletividade de degradação contra HDAC-1.

Palavras-chave: anemia falciforme, hemoglobinopatia, epigenética, síntese orgânica, hemoglobina

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary hemoglobinopathies caused by a single mutation in the gene of β -globin. Due to this mutation, a mutated hemoglobin is formed (HbS) leading to polymerization and causing irreversible changes in the morphology of red blood cells, which get a sickle shape and is responsible for the pathophysiology of the disease. Among the strategies described in the literature for the treatment of SCA is the induction of the expression of γ -globin and production of fetal hemoglobin (HbF), which is able to diminish the symptoms by reducing the polymerization and was the chosen strategy in this work. Epigenetic enzymes called histone deacetylases (HDACs) 1 and 2 were explored as targets for the development of new γ -globin and HbF inducers. Therefore, this work was divided into two parts: 1) Design, synthesis and pharmacological evaluation of new HDAC 1 and 2 inhibitors; 2) Design, synthesis and pharmacological evaluation of new PROTACs for degradation of HDAC 1 and 2. In the part 1, it was synthesized 24 intermediates and 7 final products in yields ranging from 29 and 85%. Two of the most promising compounds presented IC_{50} values ranging from 17 to 950 nM and interesting selectivity towards HDACs 1 and 2. Preliminary assay in erythroleukemic cells (K562) demonstrated that both compounds were able to increase γ -globin expression by, approximately, 7-fold at 1 μ M in a period of time of 72 and 96 hours, being most promising than the drug used in therapy, hydroxyurea (increase by 2.5-fold at 30 μ M). In the part 2, it was synthesized 45 intermediates and 13 new final PROTACs with yields ranging from 30 to 65%. All compounds were evaluated towards HDAC 1-3 degradation and, in general, all of them presented selective degradation of HDAC-1. Compounds ARP-26, ARP-37 and ARP-49 presented the better degradation levels ranging from 41 to 60% against HDAC-1. DC_{50} values from compounds ARP-26 and ARP-49 were determined and shown approximately 50% of degradation at 2.5 μ M. Therefore, in this work was possible to synthesize and characterize new HDAC inhibitors with interesting selectivity against HDAC- 1 and 2 with ability of induction of γ -globin in levels that exceed the results seen for the standard drug. It was also possible to synthesize and characterize new PROTACs with degradation selectivity against HDAC-1.

Key-words: sickle cell anemia, hemoglobinopathies, epigenetic, organic synthesis, hemoglobin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de representação da hemoglobina normal e das hemoglobinas geradas a partir da mutação do gene da globina β	32
Figura 2. Representação da polimerização da HbS e modificações da forma da hemácia	33
Figura 3. Processo de vaso-oclusão e exemplos das principais complicações encontradas em pacientes falciformes	35
Figura 4. Curvas de tendência de incidência de morte de pacientes falciformes no Brasil	36
Figura 5. Estrutura química dos fármacos hidroxiureia, L-glutamina e voxelotor	39
Figura 6. Síntese de globinas durante a gestação e desenvolvimento do neonato	40
Figura 7. Papel dos fatores de transcrição e das HDACs na regulação da expressão de γ -globina	41
Figura 8. Estrutura química dos inibidores de LSD-1 e DNMT	43
Figura 9. Mecanismo de atuação das HDACs	44
Figura 10. Estrutura do sítio ativo das HDACs Classe I	45
Figura 11. Sobreposição HDAC 2 (rosa) e 3 (dourado)	46
Figura 12. Sobreposição das HDACs 2 (rosa), 3 (dourado) e 8 (azul)	46
Figura 13. Ciclo de ubiquitinação de proteínas	51
Figura 14. Mecanismo de ação das PROTACs	52
Figura 15. Estrutura das PROTACs 1-4 e Western blot da avaliação da degradação das HDACs 1-3	53
Figura 16. Estrutura da molécula JSRF5 e seus valores de inibição enzimática contra as HDACs 1 e 2	54
Figura 17. Esquema do planejamento estrutural dos inibidores de HDAC	55
Figura 18. Planejamento estrutural das PROTACs e estrutura química do composto ARP-26	57
Figura 19. Rota sintética para obtenção dos compostos (18) a (21)	61
Figura 20. Rota sintética para obtenção dos compostos (26) -(28)	62
Figura 21. Etapa de obtenção do ligante de E3-ligase (ARP-01)	63
Figura 22. Rota sintética de obtenção dos intermediários ARP-04 , ARP-07 , ARP-17 , ARP-32 e ARP-35	63
Figura 23. Rota sintética de obtenção dos intermediários ARP-23 e ARP-36	64
Figura 24. Rotas sintéticas de obtenção das subunidades dos inibidores de HDAC ARP-14 e ARP-45	65
Figura 25. Rota sintética de obtenção das séries I e II das PROTACs	67
Figura 26. Esquema das moléculas utilizadas no estudo de modelagem molecular	72
Figura 27. Modo de interação com o sítio ativo da HDAC-2	74
Figura 28. Representação da ocupação da cavidade interna do sítio ativo da HDAC-2	74

Figura 29. Interação adicional realizada pelos compostos avaliados no docking	76
Figura 30. Sobreposição das poses da Figura 29	76
Figura 31. Estrutura química dos compostos selecionados para síntese	77
Figura 32. Valor de IC ₅₀ e porcentagem de inibição enzimática contra as HDACs 1-3, 6, 8 e 11 do composto (21)	103
Figura 33. Valor de IC ₅₀ e porcentagem de inibição enzimática contra as HDACs 1-3, 6, 8 e 11 do composto (31)	104
Figura 34. Número de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) após tratamento com composto (21)	106
Figura 35. Número de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) após tratamento com composto (31)	106
Figura 36. Expressão de γ -globina pós-tratamento com composto (21)	107
Figura 37. Expressão de γ -globina pós-tratamento com composto (31)	108
Figura 38. Mecanismo da reação de obtenção do composto ARP-01	109
Figura 39. Espectro de massas do composto ARP-01	111
Figura 40. Esquema do mecanismo de reação da S _N Ar	112
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H do subproduto obtido na S _N Ar	113
Figura 42. Esquema do mecanismo de reação com brometo de tionila	119
Figura 43. Espectro de massas de alta resolução dos compostos ARP-17 e ARP-35	121
Figura 44. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	173
Figura 45. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	174
Figura 46. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	175
Figura 47. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	175
Figura 48. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	176
Figura 49. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	177
Figura 50. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	178
Figura 51. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	178
Figura 52. Avaliação de DC ₅₀ do composto ARP-26	179
Figura 53. Avaliação de DC ₅₀ do composto ARP-49	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos CI-994, MGCD-0103 e MS-275 em μM	47
Tabela 2. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos (I) , (II) , BRD4884 e ACY-957 em μM	48
Tabela 3. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (1)	78
Tabela 4. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (2) - (5)	80
Tabela 5. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (6) - (9)	82
Tabela 6. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (10) e (11)	84
Tabela 7. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (12) e (13)	85
Tabela 8. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (14) e (15)	88
Tabela 9. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (16) e (17)	89
Tabela 10. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (18) e (19)	92
Tabela 11. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (20) e (21)	93
Tabela 12. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (22) e (23)	94
Tabela 13. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (24) e (25)	96
Tabela 14. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos finais (29) a (31)	98
Tabela 15. Porcentagem de inibição da atividade das HDACs 1 e 2 a $1\ \mu\text{M}$	100
Tabela 16. Deslocamento químico e constantes de acoplamento do composto ARP-01	110
Tabela 17. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-04 , ARP-07 e ARP-16	114
Tabela 18. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-32 e ARP-33	117
Tabela 19. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-17 e ARP-35	119
Tabela 20. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-02 , ARP-03 e ARP-06	122
Tabela 21. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-23 , ARP-29 e ARP-30	124

Tabela 22. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-31 , ARP-36 e ARP-05	126
Tabela 23. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-11 e ARP-12	129
Tabela 24. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-10 , ARP-13 e ARP-14	131
Tabela 25. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-28 , ARP-41 , e ARP-43	134
Tabela 26. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-44 e ARP-45	135
Tabela 27. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-18 e ARP-20	138
Tabela 28. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-21 e ARP-26	141
Tabela 29. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-22 e ARP-25	144
Tabela 30. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-24 e ARP-27	144
Tabela 31. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-34 e ARP-37	150
Tabela 32. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-38 e ARP-39	153
Tabela 33. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-40 e ARP-42	156
Tabela 34. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-46 e ARP-47	160
Tabela 35. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-48 e ARP-49	162
Tabela 36. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-50 e ARP-53	164
Tabela 37. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-51 e ARP-58	166
Tabela 38. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-52 e ARP-54	168
Tabela 39. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-55 e ARP-56	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-AzaC - 5-azacitidina

ADMA - dimetilarginina assimétrica

AF - anemia falciforme

ATCC - *American Type Culture Collection*

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

DNMT - DNA metil transferase

DS - *docking score*

HAT - histona acetiltransferase

Hb - hemoglobina

HbA - hemoglobina adulta

HbF - hemoglobina fetal

HDAC - histona deacetilase

HU - hidroxiureia

LigPrep - *Ligand Preparation*

LSD-1 - lisina demetilase 1

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PDB - protein Data Bank

PROTAC - Proteolysis Targeting Chimera

RMN - ressonância magnética nuclear

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

ROS - espécies reativas de oxigênio

sGC - guanilato ciclase solúvel

S_N2 – substituição nucleofílica bimolecular

S_NAr - substituição nucleofílica aromática

TCP - tranilcipromina

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

VHL - Von Hippel-Lindau

Sumário

1. INTRODUÇÃO	31
1.1 Anemia falciforme.....	31
1.1.1. Aspectos gerais.....	31
1.1.2. Fisiopatologia.....	31
1.1.3. Tratamento	37
1.2. Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos	39
1.2.1. Indução de expressão de gama-globina e produção de HbF	39
1.3. Histonas deacetilases.....	43
1.3.1. Aspectos gerais e estruturais e o mecanismo de ação das HDACs	43
1.3.2. Estrutura dos inibidores de HDAC.....	46
1.3.4. Inibidores de HDACs na indução da expressão de gama-globina	49
1.4. PROTACs.....	50
1.4.1. Aspectos gerais e mecanismo de ação.....	50
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo geral.....	53
2.2. Objetivos específicos	53
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	54
3.1. Inibidores de HDAC	54
3.2. PROTACs.....	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1. Reagentes e solventes	57
4.2. Modelagem molecular	59
4.3. Metodologia sintética	60
4.3.1. Inibidores de HDAC	60
4.3.2. PROTACs	63
4.4. Métodos analíticos.....	68
4.5. Ensaio biológicos	69
4.5.1. Ensaio enzimático.....	69
4.5.2. Ensaio de degradação	69

4.5.3. Avaliação da viabilidade celular e número de células viáveis K562	70
4.5.4. Avaliação da expressão de gama-globina em células K562	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1. Modelagem Molecular	72
5.2. Síntese dos inibidores de HDAC	77
5.3. Inibição enzimática	100
5.4. Avaliação da viabilidade celular e números de células viáveis, e indução de gama-globina pelos inibidores de HDAC em K562	105
5.5. Síntese das PROTACs	109
5.6. Ensaio de degradação de HDACs 1-3	173
6. CONCLUSÃO	181
7. REFERÊNCIAS	182

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anemia falciforme

1.1.1. Aspectos gerais

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica formada por quatro cadeias globínicas e associada com um cofator heme, o qual tem como função o transporte de oxigênio. As diversas combinações de cadeias globínicas encontradas na Hb resultam nos diferentes tipos de tetrâmero que são produzidos durante três diferentes estágios de vida do ser humano: embrionário, fetal e adulto. A hemoglobina embrionária são três: Gower I (duas cadeias zeta (ζ) e duas cadeias épsilon (ϵ)), Gower II (duas cadeias alfa (α), e duas cadeias ϵ) e a Portland (duas cadeias ζ e duas cadeias gama (γ)), tendo sua atuação nos estágios iniciais da gestação. A hemoglobina fetal, ou HbF, apresenta duas cadeias globínicas α e duas cadeias γ , tem sua produção iniciada nos primeiros meses de gestação e é produzida majoritariamente até a troca de hemoglobinas que ocorre entre seis meses e um ano após o nascimento, quando a hemoglobina predominante passa a ser a hemoglobina adulta (HbA). A HbA apresenta duas cadeias globínicas α e duas cadeias beta (β). Uma simples troca de nucleotídeos no gene que codifica a cadeia globínica β da HbA pode resultar na formação de uma cadeia globínica e hemoglobina alteradas, as quais serão as responsáveis pela fisiopatologia e sintomas que caracterizam a hemoglobinopatia mais prevalente no mundo, denominada de anemia falciforme (AF).

1.1.2. Fisiopatologia

A AF foi descrita pela primeira vez pelo médico James Herrick em 1910 e é uma das primeiras doenças genéticas entendidas molecularmente (PAULING *et al.*, 1949). É caracterizada como uma hemoglobinopatia causada por uma mutação no gene que codifica a cadeia β da HbA. Como demonstrado na Figura 1, o sexto códon do gene da globina β normal é composto por guanina-adenina-guanina (GAG) e é responsável por codificar um ácido glutâmico (INGRAM, 1956; KATO *et al.*, 2018). Esse aminoácido está posicionado na região superficial da globina e, em pH fisiológico, sua subunidade ácido carboxílico apresenta-se desprotonada e causa repulsão ao se aproximar de outras cadeias globínicas, mantendo assim a hemoglobina “solúvel” no interior da

hemácia. Na AF, há uma mutação que resulta na troca da adenina por uma timina, gerando o códon GTG, o qual codifica uma valina. A valina é um aminoácido hidrofóbico e que não apresenta carga, sendo assim, em ambientes de baixa tensão de oxigênio será capaz de interagir com outros aminoácidos como alanina, fenilalanina e leucina de outras cadeias globínicas, resultando na aproximação das hemoglobinas e consequente polimerização das mesmas (VEKILOV, 2007) (Figura 1). Quando essa mutação ocorre em apenas uma das fitas de DNA denomina-se traço falciforme e quando ocorre em ambas as fitas se denomina AF (Figura 1). A hemoglobina mutada presente nos pacientes falciformes apresenta duas cadeias α e duas cadeias mutadas chamadas β^S e é denominada de HbS (*sickle hemoglobin*).

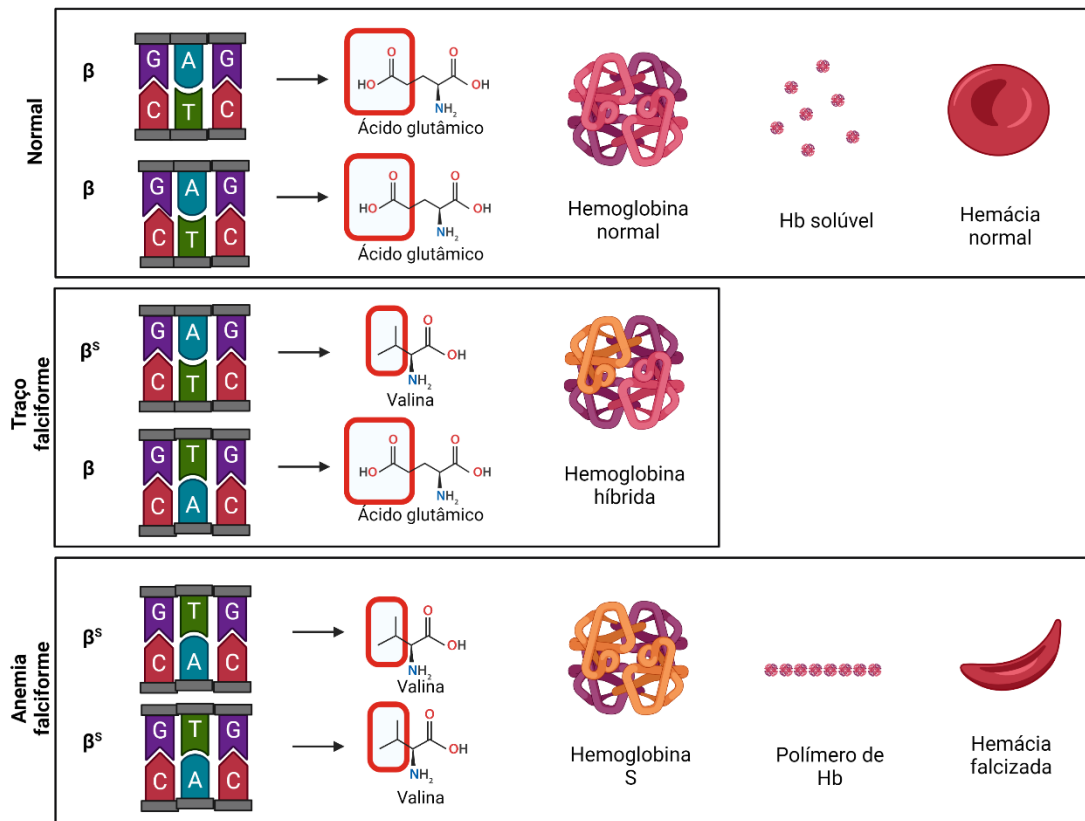


Figura 1. Esquema de representação da hemoglobina normal e das hemoglobinas geradas a partir da mutação do gene da globina β

Fonte: Criado com BioRender.com

Quando em seu estado oxigenado (estado relaxado ou estado R), a HbS se mantém solúvel dentro da hemácia. Em ambientes de baixa tensão de oxigênio, a hemoglobina adota a sua conformação desoxigenada (estado tenso ou estado T) e polimeriza-se formando fibras helicoidais de 14 filamentos organizados em fita dupla que são estabilizadas por interações secundárias com outras moléculas de HbS (HARRINGTON *et al.*, 1997) (Figura 2). Diminuição de pH, concentrações elevadas de HbS, baixas temperaturas e presença de hemoglobinas normais também influenciam nas taxas de polimerização da HbS. Essas fibras forçam a mudança de formato da hemácia, alterando suas propriedades mecânicas e reológicas de forma significativa (BRIEHL, 1983; FRENETTE; ATWEH, 2007) e dando à hemácia a forma de foice (Figura 2).

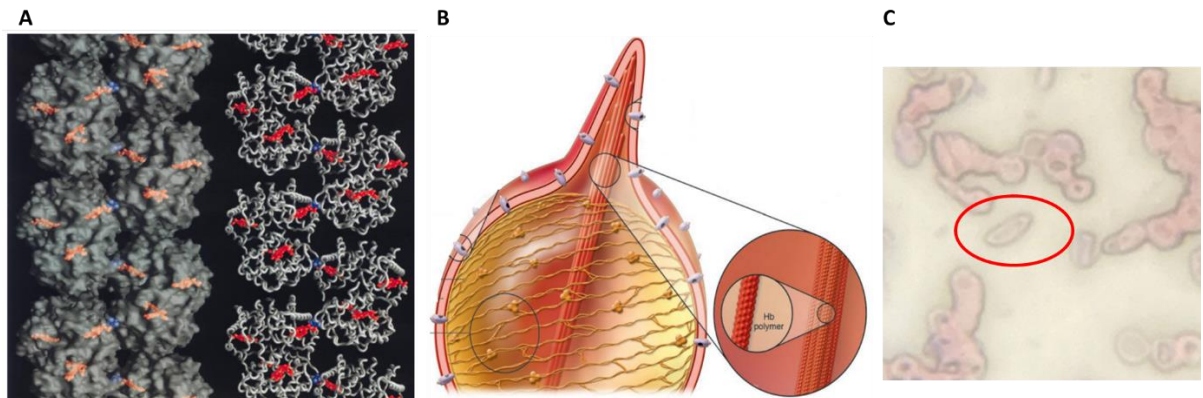


Figura 2. Representação da polimerização da HbS e modificações da forma da hemácia. (A) Representação da fita dupla de HbS encontrada no cristal, onde a valina da cadeia β apresenta cor azul e é possível identificar as interações desse aminoácido com as cadeias adjacentes; (B) Crescimento da fibra de hemoglobinas e a alteração causada na membrana da hemácia; (C) Imagem de lâmina de esfregaço sanguíneo de um paciente falciforme destacando-se a hemácia falciforme.

Fonte: (A) Imagem retirada de (HARRINGTON *et al.*, 1997); (B) Imagem retirada e adaptada de (FRENETTE; ATWEH, 2007)

Devido às alterações na membrana da hemácia, as taxas de hemólise intra- e extra-vascular aumentam, o que é responsável pela diminuição da vida da hemácia em até 75% (KATO *et al.*, 2018; QUINN *et al.*, 2016). A hemólise tem como consequência a liberação do conteúdo intracelular, dentre os quais destacam-se a hemoglobina, enzima L-arginase e dimetilarginina assimétrica (ADMA). A enzima L-arginase converte arginina em ornitina e uréia, e reduz a

concentração plasmática de arginina que atua como substrato da enzima óxido nítrico sintase (NOS) para produção de óxido nítrico (NO), enquanto a ADMA atua como inibidor de NOS. Esses fatores fazem com que a NOS não altere sua conformação, o que seria essencial para síntese de NO, e comece a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, as moléculas de hemoglobinas livres são capazes de sequestrar o NO circulante, diminuindo assim a biodisponibilidade do mesmo (KATO *et al.*, 2017; ZENNADI *et al.*, 2008). A baixa disponibilidade de NO resulta em um processo denominado disfunção vascular e efeitos como a ativação de células endoteliais, ativação de plaquetas e vasoconstrição (KATO *et al.*, 2017).

A ativação das células endoteliais na AF ocorre devido à interação das hemácias falciformes, hemoglobina e grupo heme livres com o endotélio, e também devido à hipoxia que é induzida pela maior concentração de ROS (HEBBEL, 1997, 2008). Além disso, as baixas taxas de NO induzem o aumento da produção de endotelina-1 e da expressão de moléculas de adesão, como VCAM1, ICAM1, P-selectina, E-selectina, entre outras, resultando no aumento da adesão dos eritrócitos e leucócitos (INCALZA *et al.*, 2018; STORCH *et al.*, 2017). Os eritrócitos falciformes apresentam uma taxa de adesão celular aumentada quando comparada aos eritrócitos normais devido a um aumento da expressão de moléculas de adesão em sua superfície (HEBBEL, 2008).

Destaca-se ainda na doença o processo inflamatório crônico, com aumento dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL) IL-1 β e IL-6 (MALAVÉ *et al.*, 1993; OWUSU-ANSAH *et al.*, 2015). O TNF- α aumenta as propriedades quimiotáticas, induz mudanças nas propriedades coagulantes e anticoagulantes, aumenta a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, e contribui para o aumento das moléculas de adesão (ICAM, VCAM). Estimula ainda, a produção de radicais livres e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 β e PGE2 (LANARO *et al.*, 2009; MALAVÉ *et al.*, 1993).

A Figura 3 apresenta uma representação da formação do agregado heterocelular formado entre eritrócito falciforme, plaquetas ativadas e neutrófilos. Esse agregado é responsável pelo processo de vaso-oclusão que causa as crises vaso-oclusivas dolorosas em pacientes falciformes, e representa a manifestação clínica mais frequente da doença. A vaso-oclusão resulta em infarto

de pequenos e médios vasos que irão gerar dores crônicas, infarto e lesão de órgãos e tecidos, e aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Dentre as complicações agudas e crônicas do indivíduo pode-se destacar as dores crônicas, hipertensão pulmonar, anemia hemolítica, priapismo, infarto do baço, da medula óssea e da retina, crise torácica aguda, entre outros (KATO *et al.*, 2007).

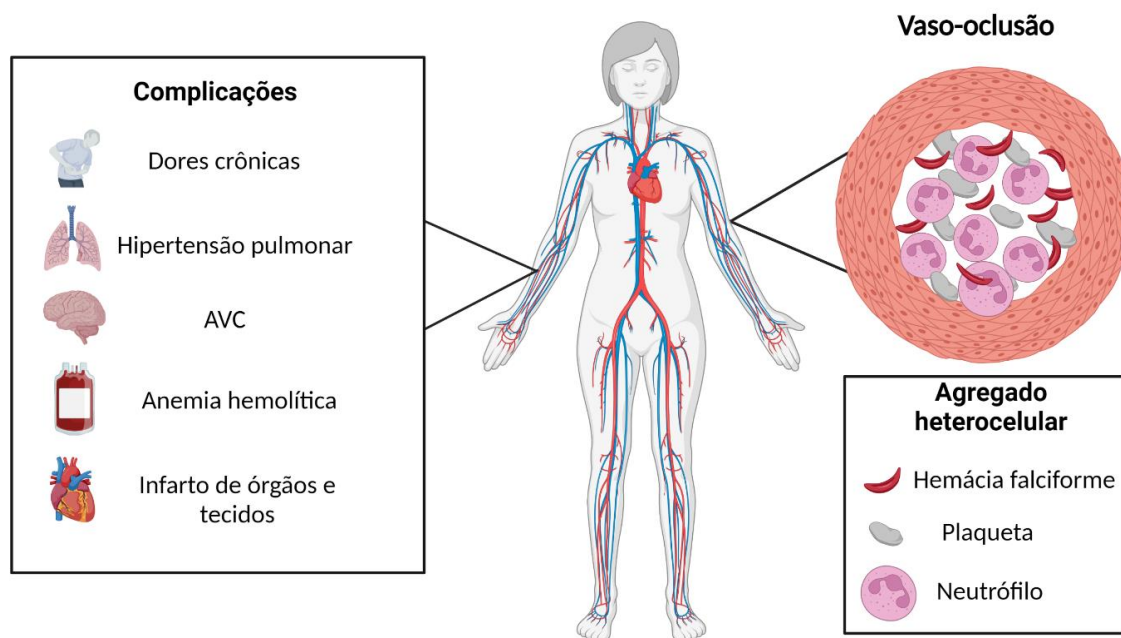


Figura 3. Processo de vaso-oclusão e exemplos das principais complicações encontradas em pacientes falciformes

Fonte: Criado com BioRender.com

Estima-se que mundialmente nasçam cerca de 5.476.407 crianças com o traço falciforme e 312.302 com a AF por ano. Aproximadamente 75% dos nascidos com AF são da região da África Subsaariana, enquanto que nos EUA a taxa é de 3 mil nascimentos e no Reino Unido cerca de 300 nascimentos por ano (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015; PIEL *et al.*, 2013). No Brasil, dados do ministério da saúde de 2016 apontaram o nascimento de 1071 indivíduos com doença falciforme, e em 2020 60.094 casos de pacientes heterozigotos e 964 casos de doença falciforme. Os custos diretos e indiretos relacionados à AF no Brasil foram estimados em 1,5 bilhão de reais em 2018 (PINTO *et al.*, 2020).

Em relação às taxas de mortalidade, foram registrados no Brasil 6.813 óbitos de pacientes falciformes entre 1997 e 2017. A região sudeste compreendeu 48,39% desse número, seguida das regiões Nordeste (31,92%), Centro-Oeste (10,3%), Norte (4,96%) e Sul (4,39%). Como demonstrado na Figura 4, dentre os anos 2001 e 2014 houve tendência de aumento na incidência de mortes, enquanto a partir de 2015 o gráfico mostra um declínio. A tendência de aumento em anos anteriores à 2015 pode ser explicada devido à subnotificação ocorrida devido à dificuldade de diagnóstico e/ou falta de registros hospitalares. O programa nacional de triagem neonatal (PNTN) no Brasil teve início em 2001, e a evolução crescente dos óbitos mostrados na Figura 4 seguiu o aumento da cobertura do programa. Em relação às regiões brasileiras, todas seguiram a mesma tendência nacional, com exceção do centro-oeste onde se visualiza uma maior variação dentre os anos (MOTA *et al.*, 2022).

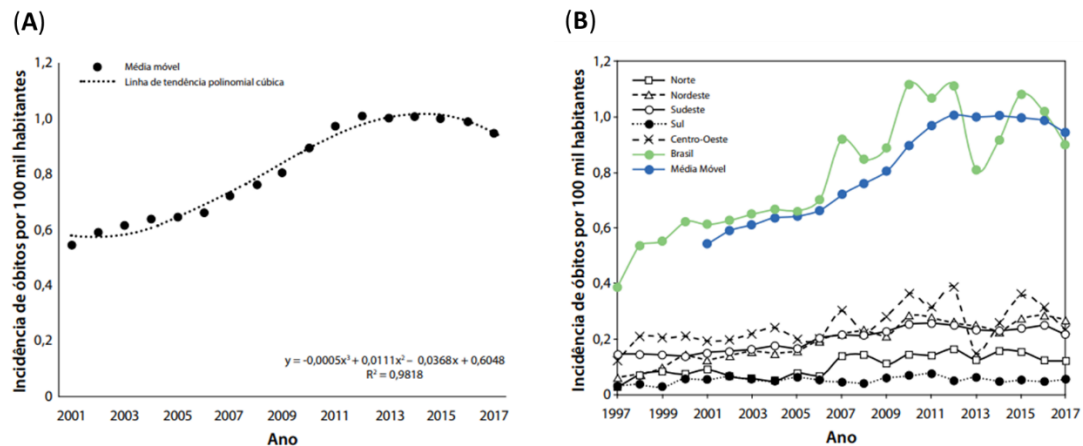


Figura 4. Curvas de tendência de incidência de morte de pacientes falciformes no Brasil (A) e em relação às regiões do país (B).

Fonte: Imagens retiradas e adaptadas de (MOTA *et al.*, 2022).

A faixa etária entre 15 e 34 anos foi a mais predominante dentro os óbitos registrados, dado que reflete a baixa expectativa de vida de pacientes falciformes no Brasil (MOTA *et al.*, 2022). Nos EUA, por exemplo, a expectativa de vida de um paciente falciforme é de cerca de 54 anos, enquanto de um indivíduo sadio chega a 75 anos (LUBECK *et al.*, 2019).

1.1.3. Tratamento

Atualmente, existem 4 fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da AF, sendo eles: hidroxiureia (HU), L-glutamina, voxelotor e crizanlizumab (PAVAN; DOS SANTOS, 2021).

A HU (Figura 5) foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da AF pelo FDA (1998) e Europa (2007). O principal mecanismo de ação da HU aplicado à AF é através da indução da expressão da γ -globina e aumento da produção de HbF através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (COKIC *et al.*, 2003). É proposto que o mecanismo de ativação da sGC seja através da reação da HU com a enzima, resultando no aumento dos níveis de cGMP e indução de γ -globina (COKIC *et al.*, 2008; COKIC, V. P. *et al.*, 2003). Além disso, a HU também atua através da doação de óxido nítrico por ser capaz de reagir com a hemoglobina (HUANG *et al.*, 2002), peroxidase (HUANG *et al.*, 2002) e enzimas catalase (HUANG *et al.*, 2004). Apesar desses efeitos benéficos, a HU apresenta sérios efeitos adversos como a mielossupressão e efeito genotóxico em tratamentos a longo prazo (NAHAVANDI *et al.*, 2000).

A L-glutamina (Figura 5) foi o segundo fármaco a ser aprovado pelo FDA (2017) para o tratamento da AF. Foi demonstrado que pacientes tratados com L-glutamina apresentaram redução nas taxas de hospitalização e da frequência de crises dolorosas. Esse aminoácido é substrato para a síntese de glutatona, NAD(H) e NADP(H), e óxido nítrico, sendo então essencial para o mecanismo antioxidante do eritrócito (SADAF; QUINN, 2020). Quatro ensaios clínicos foram realizados utilizando-se a L-glutamina em pacientes falciformes: o primeiro contou com uma amostra pequena de 7 pacientes, mas foi capaz de demonstrar que a suplementação com 30g de L-glutamina administrada diariamente aumentou o potencial redox ($47.2 \pm 3.7\%$ to $62.1 \pm 11.8\%$) e os níveis de NADH nos eritrócitos falciformes (47.5 ± 6.3 to 72.1 ± 15.1 nmol/mL) (NIIHARA *et al.*, 1998); o segundo estudo foi realizado com vinte e sete crianças e adolescentes utilizando 600mg/kg por dia de L-glutamina por 24 semanas, apresentando redução de 6% no gasto energético em repouso e aumento dos parâmetros nutricionais (WILLIAMS *et al.*, 2004); num estudo de fase II randomizado, duplo-cego, com controle de placebo e multicêntrico conduzido com doses de L-glutamina de 0.3 g/kg duas vezes ao dia por 48 semanas resultou numa redução de 40% da frequência de hospitalização e mais de 50% de redução de crises dolorosas

(NIIHARA, 2014); o último estudo, de fase III, multicêntrico, randomizado e duplo-cego com 230 pacientes e mesmo regime de dose do estudo anterior, mostrou novamente redução da frequência de hospitalização e de crises dolorosas, o que levou então a aprovação da L-glutamina (NIIHARA *et al.*, 2018).

O voxelotor (Figura 5) é um fármaco oral aprovado pelo FDA em 2019. Seu mecanismo de ação é através de sua reação com a amina terminal das cadeias α da HbS formando uma ligação covalente reversível e aumentando a estabilidade da HbS em sua forma oxigenada. O tratamento *in vitro* da HbS com voxelotor foi capaz de atrasar o processo de polimerização (DUFU *et al.*, 2018). Estudo *in vitro* e *in vivo* foram capazes de demonstrar que voxelotor apresenta alta especificidade pela cadeia α da HbS e necessita apenas de uma dose diária, o que aumentaria a aceitação dos pacientes ao tratamento (HUTCHALEELAHA *et al.*, 2019). Em estudos clínicos de fase 1/2, 16 pacientes tratados com 700 ou 900 mg de voxelotor por 90 dias apresentaram níveis aumentados de Hb, redução da falcização das hemácias e da taxa de hemólise (HOWARD *et al.*, 2019). Pacientes que apresentavam sintomas graves da doença foram tratados com 900 mg de voxelotor por 6-17 meses e foi possível visualizar níveis aumentados de Hb e da saturação de oxigênio, o que diminuiu as taxas de hospitalização devido às crises vaso-oclusivas. Os pacientes não apresentaram efeitos adversos (BLYDEN *et al.*, 2018). Resultados similares foram observados em ensaio clínico de fase 3 com doses de 900 e 1500 mg (NCT03036813).

O último fármaco aprovado pelo FDA foi o crizanlizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado, responsável por se ligar à P-selectina e bloquear sua interação com a glicoproteína-1, diminuindo assim a adesão celular e o processo vaso-oclusivo. Em um estudo clínico de fase 2, doses de 5 mg/kg de crizanlizumabe foram capazes de reduzir em até 45,3% a taxa média de crises dolorosas após 52 semanas de tratamento (ATAGA *et al.*, 2017). Foi também demonstrado que o tratamento com crizanlizumabe foi capaz de atrasar o tempo da primeira crise vaso-oclusiva, passando de 1,38 meses no grupo placebo para 4,07 meses no grupo tratado (KUTLAR *et al.*, 2019). Crizanlizumabe foi aprovado em 2019 com o objetivo de reduzir as crises vaso-oclusivas em pacientes adultos e pediátricos maiores de 16 anos (BLAIR, 2020).

No cenário brasileiro, a HU é o único fármaco que faz parte das diretrizes do SUS para o tratamento da AF. O voxelotor e L-glutamina ainda não estão registrados na ANVISA e o crizanlizumabe obteve registro em 2020, porém ainda não foi incluído nas diretrizes (CONITEC, 2022).

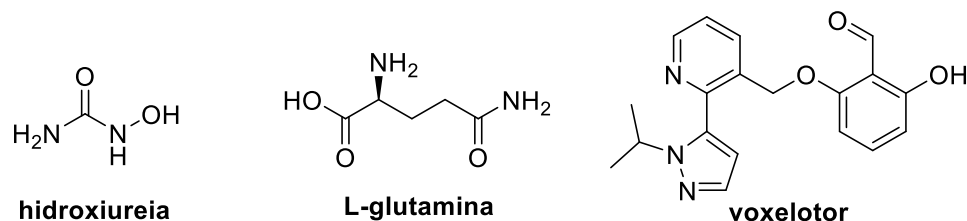


Figura 5. Estrutura química dos fármacos hidroxiureia, L-glutamina e voxelotor

Fonte: Própria autora

1.2. Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos

1.2.1. Indução de expressão de gama-globina e produção de HbF

Devido ao caráter genético da AF, as estratégias para o tratamento farmacológico da doença se baseiam no controle e minimização dos sintomas. No Brasil, por exemplo, a terapia preconizada nas diretrizes do SUS engloba a HU como fármaco para prevenir crises e complicações da doença por ser capaz de induzir a produção de HbF e, assim, diminuir as taxas de hemólise, de expressão de moléculas de adesão e aumentar as taxas de hemoglobina. Utiliza-se também antibióticos como a penicilina para profilaxia de infecções, e analgésicos e anti-inflamatórios como adjuvantes (PCDT, 2018).

Na literatura existem diversas abordagens sendo estudadas para o tratamento da AF, como estudo de compostos antioxidantes (DO NASCIMENTO *et al.*, 2013; FIBACH *et al.*, 2012) e doadores de óxido nítrico (ABID *et al.*, 2018; CANALLI *et al.*, 2008) com foco no controle da disfunção endotelial; compostos que são capazes de diminuir a desidratação do eritrócito ajudando no controle da polimerização da HbS (ABU-SALAH; GAMBO, 2002; BRUGNARA *et al.*, 1996); ligantes covalentes (ABDULMALIK *et al.*, 2020) e não covalentes (GOPALSAMY *et al.*, 2021) de hemoglobina para inibição da polimerização e compostos capazes de induzir a expressão de γ -globina e produção de HbF (PAVAN *et al.*, 2022), sendo esta última a mais estudada.

Um dos fatores que influencia na polimerização da HbS é sua concentração dentro da hemácia. Sendo assim, quando os níveis de HbF estão aumentados, a taxa de polimerização é reduzida, pois a HbF não é capaz de polimerizar (EATON, 2020). Esses resultados já foram visualizados em pacientes falciformes que naturalmente expressavam níveis aumentados de γ -globina e níveis maiores de HbF. Esse fator inclusive é determinante na gravidade dos sintomas dos pacientes, ou seja, pacientes que apresentam níveis aumentados de HbF apresentam sintomas menos severos da doença (PLATT *et al.*, 1994; REES *et al.*, 2022).

Como descrito anteriormente, a HbF é produzida dentre os meses iniciais de gestação até os primeiros meses pós nascimento (Figura 6) e seu mecanismo de regulação tem sido extensivamente estudado.

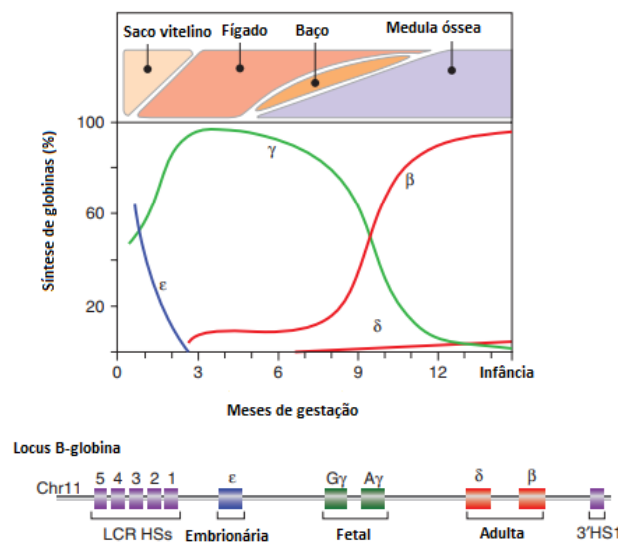


Figura 6. Síntese de globinas durante a gestação e desenvolvimento do neonato

Fonte: Figura retirada e adaptada de (SANKARAN; ORKIN, 2013)

Um dos motivos que explica a diminuição da expressão da γ -globina é o silenciamento do gene dessa globina presente no locus da globina β . A Figura 7 apresenta um resumo dos fatores de transcrição, complexos e enzimas epigenéticas que atuam na regulação da expressão desse gene os quais tem sido explorado como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.

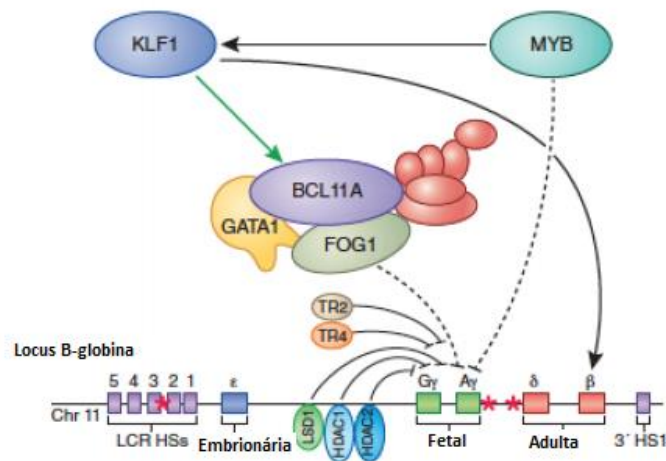


Figura 7. Papel dos fatores de transcrição e das HDACs na regulação da expressão de γ -globina (KLF1 - Kruppel Like Factor 1; BCL11A - B cell lymphoma/leukemia 11A; FOG-1- Friend of GATA-1; HDAC – Histona deacetilase).

Fonte: Figura retirada e adaptada de (SANKARAN; WEISS, 2015).

Dentre as enzimas epigenéticas envolvidas nesse processo de silenciamento destacam-se a DNA metil transferase (DNMT) que atua diretamente no DNA, e a lisina demetilase 1 (LSD1), e as histonas deacetilases 1 e 2 (HDAC1 e HDAC2) que atuam nos nucleossomos.

Tem sido descrito que sequências CpG do DNA em tecidos eritropoiéticos são metiladas na região do gene da γ -globina, sugerindo que a metilação do DNA é um dos reguladores epigenéticos da expressão desse gene (VAN DER PLOEG; FLAVELL, 1980). Baseado nessa informação, o uso de moléculas capazes de incorporar no DNA e evitar a metilação, como a 5-azacitidina (5-azaC) (Figura 8), se tornou uma abordagem interessante. A 5-azaC é um agente hipometilante capaz de se ligar covalentemente à DNMT, evitando a metilação do DNA e, consequentemente, o silenciamento gênico. O primeiro estudo *in vivo* realizado com essa molécula foi realizado com 13 babuínos anêmicos utilizando-se diferentes regimes posológicos. Os resultados iniciais demonstraram que a 5-azaC foi capaz de aumentar a produção de HbF e o número de células F (células que contêm HbF), alcançando as maiores taxas entre os dias 5 e 7 após a descontinuação do tratamento. Em contrapartida, o número de leucócitos reduziu pela metade, mostrando também o efeito citotóxico desse composto (DESIMONE *et al.*, 1982). Ensaios clínicos foram também realizados com a 5-azaC demonstrando seu potencial em induzir a

expressão de γ -globina e HbF, porém essa molécula demonstrou ser carcinogênica tornando inviável a continuação do seu estudo para aplicação na AF (CARR *et al.*, 1984, 1988).

A decitabina (Figura 8) é análoga à 5-azaC, porém aparentemente não apresenta os mesmos efeitos deletérios quando administrada em baixas doses. Em estudos clínicos de fase 1/2 com 8 pacientes falciformes não-responsivos à HU onde as taxas de γ -globina aumentaram de 3,19% para 13,66%, os níveis de HbF subiram de 3,55% para 13,45% e a porcentagem de células F subiu de 21% para 55% (KOSHY *et al.*, 2000). Resultados similares foram encontrados em outros estudos, porém a decitabina tem como inconveniente a necessidade de sua administração ser realizada por via endovenosa ou subcutânea, o que diminui a taxa de aceitação dos pacientes (DESIMONE *et al.*, 2002; SAUNTHARARAJAH *et al.*, 2003). Já foram também realizados aprimoramentos na estrutura da decitabina de forma que sua utilização em forma de sal fosse utilizada (LAVELLE *et al.*, 2007).

A LSD-1 é uma enzima epigenética responsável pela remoção dos grupamentos metila do lisinas mono- e di-metiladas (H3K4), resultando no silenciamento gênico (SHI *et al.*, 2004). Em um estudo conduzido por Shi e colaboradores foi demonstrado que durante a diferenciação celular de células CD34⁺, a LSD-1 se liga ao promotor das globinas ϵ -, β - e γ . Com o tratamento dessas células utilizando-se inibidores de LSD-1 como tranilcipromina (TCP – IC₅₀ 2 μ M) (Figura 8), houve um aumento significativo da taxa de metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4) do promotor do gene da γ -globina, indução da expressão da γ -globina em 9,4 vezes e aumento de 4,6% da produção de HbF. Para comprovação dos dados obtidos foi realizado o knockdown da LSD-1, com o qual obteve resultados semelhantes, comprovando a atuação da LSD-1 no silenciamento da γ -globina (SHI *et al.*, 2013).

As HDACs são as enzimas epigenéticas mais estudadas e descritas na literatura. Seu mecanismo de controle epigenético é bem estabelecido e, portanto, sua utilização como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças como câncer, HIV e AF, por exemplo, é vasta. Sendo as HDACs o alvo escolhido para o desenvolvimento deste trabalho, sua estrutura, mecanismo de ação e aplicação para AF serão descritas no tópico a seguir.

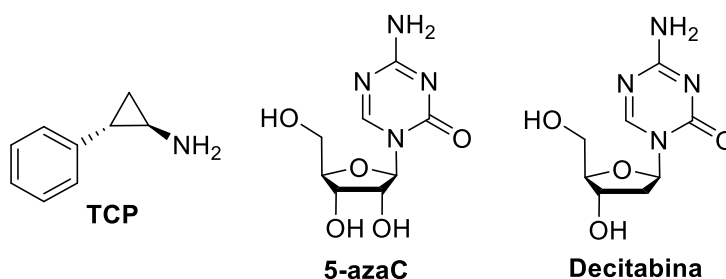


Figura 8. Estrutura química dos inibidores de LSD-1 e DNMT

Fonte: Própria autora

1.3. Histonas deacetilases

1.3.1. Aspectos gerais e estruturais e o mecanismo de ação das HDACs

A transcrição em células eucarióticas é influenciada pela forma como o material genético se organiza. Em estado de repouso, o DNA está altamente compactado na cromatina a fim de evitar o acesso ao material genético por fatores de transcrição. A subunidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, um octâmero constituído por 4 tipos diferentes de histonas (H3/H4 e H2A/H2B) envolvidos por 146 pares de base do DNA (Figura 9). Durante a transcrição gênica, modificações no nucleossomo como, por exemplo, acetilação de histonas, favorecem a ligação de proteínas e fatores de transcrição ao DNA (LUGER *et al.*, 1998).

A acetilação e deacetilação de resíduos de lisina em histonas são modificações pós-translacionais cruciais para regulação epigenética (KOUZARIDES, 2007). Os efeitos opostos das enzimas histona acetiltransferase (HAT) e HDAC mantêm o controle do processo de transcrição. A HAT é responsável por transferir grupos acetil à amina ϵ do resíduo de lisina em histonas neutralizando a carga desse aminoácido. Com a neutralização da carga, a interação da cauda da histona com o DNA é diminuída, o que resulta no relaxamento da cromatina e, consequentemente, na indução da transcrição gênica. Já a HDAC é responsável pela remoção dos grupamentos acetil introduzidos pela HAT, restaurando a carga do aminoácido e a interação da cauda com o DNA. Como consequência, a cromatina volta a se condensar e resulta no silenciamento gênico da região (Figura 9) (BOLDEN *et al.*, 2006; THIAGALINGAM *et al.*, 2003).

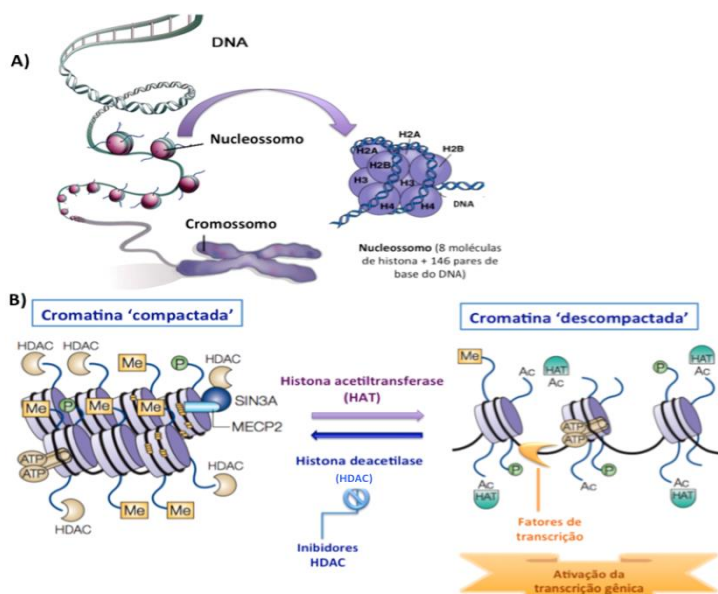


Figura 9. Mecanismo de atuação das HDACs A) Estrutura do nucleossomo; B) Mecanismo da acetilação de histonas mantendo a estrutura da cromatina condensada, impedindo por exemplo, o acesso ao DNA pelos fatores de transcrição.

Fonte: Figura adaptada de (JOHNSTONE, 2002).

Em humanos são descritas 18 isoformas de HDAC, divididas em 4 classes principais (JOHNSTONE, 2002). A classe I é constituída pelas HDACs 1, 2, 3 e 8; a classe II é constituída pelas HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10; a classe III inclui as SirT 1-7 e a classe IV apresenta HDAC 11. As HDACs pertencentes às classes I, II e IV são enzimas zinco dependentes, enquanto a HDACs da classe III são NAD^+ dependentes (BOLDEN *et al.*, 2006).

Como será discutido em tópico adiante, as HDACs de Classe I estão relacionadas com a aplicação desse alvo para o tratamento da AF, sendo assim, apenas os aspectos estruturais desta classe serão discutidos aqui. Os aspectos estruturais das outras classes podem ser encontrados em diversos artigos científicos disponíveis na literatura (BIELIAUSKAS *et al.*, 2008; BUTLER; KOZIKOWSKI, 2008; DI MICCO *et al.*, 2013; ESTIU *et al.*, 2008).

O sítio ativo das HDACs Classe I apresenta regiões bem definidas. A análise por cristalografia de raios-X para HDAC de Classe I mostra a presença de uma cavidade interna de 14 Å abaixo do canal de hidrofóbico de 11 Å, próximo ao sítio ativo contendo o átomo de zinco (WANG *et al.*,

2004). HDACs de classe I apresentam ainda uma carbonila de um resíduo glicina e a cadeia lateral da tirosina no canal hidrofóbico de 11 Å. Para HDAC-1, verifica-se a Gly-149 e Tyr-303; para HDAC-2, Gly-154 e Tyr-308; para HDAC-3, Gly-143 e Tyr-298 e para HDAC-8, Gly-151 e Tyr-306 (DI MICCO *et al.*, 2013). As diferenças estruturais entre HDAC-1 e HDAC-2 são pequenas. Entre elas foi relatado 93% de similaridade na sequência de aminoácidos, conferindo formatos similares em todas as regiões da proteína (Figura 10). Entretanto, substituições na Met-233, Pro-361 e Met-364 na HDAC-2 por Leu-228, Asn-356 e Leu-359 em HDAC-1 conferem menor acesso das moléculas ao sítio catalítico de HDAC-1 comparado com HDAC-2 (Figura 10).

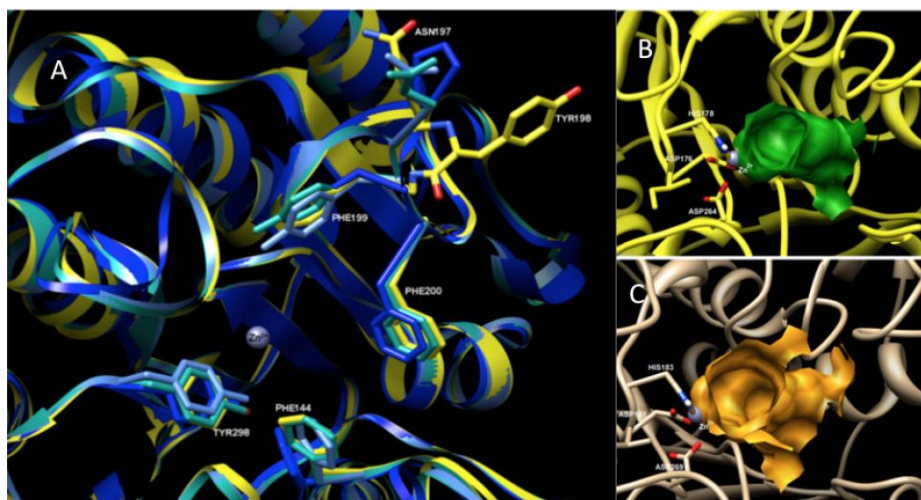


Figura 10. Estrutura do sítio ativo das HDACs Classe I A) Sobreposição HDAC-1 (azul claro), HDAC-2 (ciano), HDAC-3 (amarelo) e HDAC-8 (azul escuro) destacando a presença do átomo de zinco central presente no sítio catalítico. B) Visão superior do canal hidrofóbico de 11 Å da HDAC-1 e C) da HDAC-2. O painel B e C mostram as pequenas diferenças entre HDAC-1 e HDAC-2.

Fonte: Figuras retiradas e adaptadas de (DI MICCO *et al.*, 2013).

Já para HDAC-3 e HDAC-8, também pertencentes a classe I, diferenças menos sutis são observadas. No sítio ativo dessas duas HDACs são visualizados aminoácidos volumosos na região da cavidade de 14 Å. Como apresentado nas Figuras 11 e 12, na HDAC-3 um resíduo de tirosina substitui a serina da HDAC-2, forçando o resíduo de leucina para o centro da cavidade, resultando em impedimento estérico (Figura 11). No caso da HDAC-8, um triptofano substitui a leucina, também resultando em impedimento estérico (Figura 12) (DI MICCO *et al.*, 2013). Tais diferenças

estruturais auxiliam e possibilitam o desenvolvimento de moléculas com melhor perfil de seletividade durante o planejamento de inibidores de HDAC de classe I.

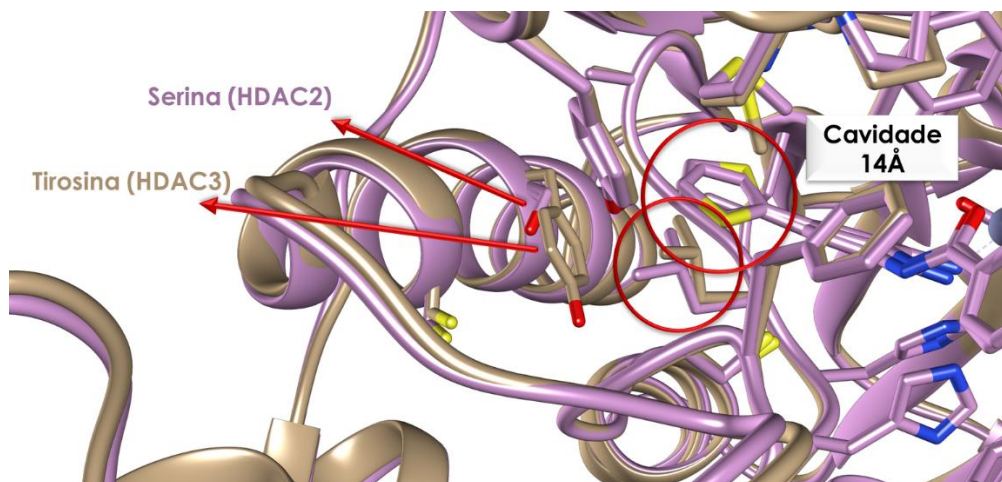


Figura 11. Sobreposição HDAC 2 (rosa) e 3 (dourado).

Fonte: Própria autora

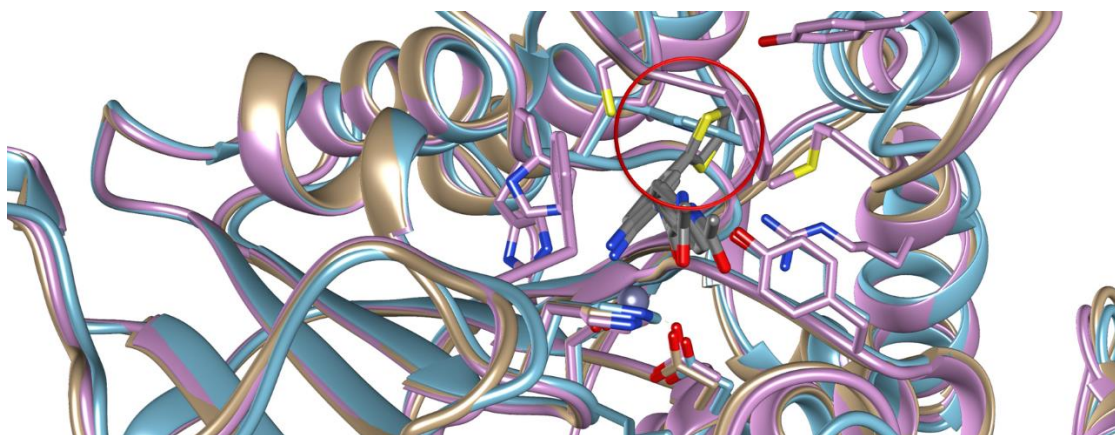


Figura 12. Sobreposição das HDACs 2 (rosa), 3 (dourado) e 8 (azul).

Fonte: Própria autora

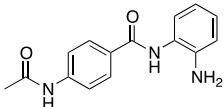
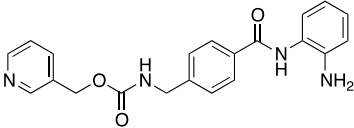
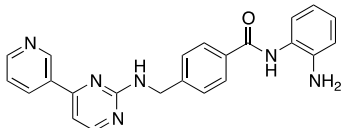
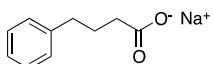
1.3.2. Estrutura dos inibidores de HDAC

Moléculas como fenilbutirato sódico são descritos como sendo capazes de aumentar em humanos os níveis de HbF devido inibição de HDAC (Tabela 1) (DOVER *et al.*, 1994). Em estudos clínicos, o derivado dimetilbutirato (HQB-1001) aumentou HbF em cerca de 80% dos voluntários (KUTLAR *et al.*, 2013). Entretanto, alta variabilidade nas respostas clínicas ainda são observadas,

e a terapia usando ‘pulsos’ de butiratos (doses menores e mais frequentes) parecem ser mais efetivas que doses únicas diárias (REID *et al.*, 2014).

O uso de inibidores de HDAC não seletivos pode levar ao bloqueio do ciclo celular e a efeitos adversos graves, entretanto, foi demonstrado que a inibição seletiva (HDAC-1 e HDAC-2) aumenta expressão de gama-globina sem causar alteração no ciclo e proliferação celular (ESRICK *et al.*, 2015). Os derivados 2-amino-benzamidas (CI-994, MS-275 e MGCD0103) (Tabela 1) demonstraram efeito inibitório seletivos às HDAC-1 e 2, sem efeitos nas HDAC 4-9. Interessantes artigos discutindo as bases estruturais para seletividade entre os diversos subtipos de HDAC têm sido publicados (BUTLER; KOZIKOWSKI, 2008; DI MICCO *et al.*, 2013; ESTIU *et al.*, 2008; ITOH *et al.*, 2008).

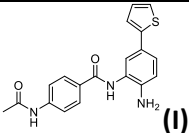
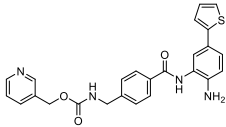
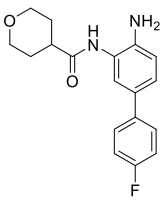
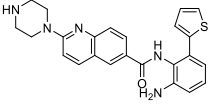
Tabela 1. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos CI-994, MS-275 e MGCD-0103 em μM (BRADNER *et al.*, 2010).

Moléculas	HDAC-1 (IC ₅₀)	HDAC-2 (IC ₅₀)	HDAC-3 (IC ₅₀)	HDAC 4 –9 (IC ₅₀)
 CI-994	0.1	0.42	1.2	> 10
 MS-275	0.02	0.06	0.5	> 10
 MGCD-0103	0.04	0.15	0.8	> 10
 Fenilbutirato	92	108	904	>1000 (HDAC-4,5, 7 e 9)

Do ponto de vista estrutural, tem sido verificado que compostos apresentando o grupo 2-amino-benzamida como ligante do metal zinco presente no sítio catalítico apresentam maior

seletividade às HDAC de classe I, principalmente HDAC-1 e HDAC-2 devido a melhores interações na cavidade interna de 11 Å presente no sítio ativo (Tabela 1) (HAMBLETT *et al.*, 2007; METHOT *et al.*, 2008; SAITO *et al.*, 1999). Além do grupamento quelante de zinco (MORADEI *et al.*, 2007; SHEARSTONE *et al.*, 2016) demonstrou-se que subunidades específicas adicionadas à posição 4 do grupo 2-amino-benzamida proporcionam um aumento na seletividade frente às HDACs 1 e 2, devido à ocupação da cavidade interna de 14 Å presente no sítio ativo dessas enzimas (MORADEI *et al.*, 2007; SHEARSTONE *et al.*, 2016; WAGNER *et al.*, 2013, 2016). A Tabela 2 apresenta as moléculas **(I)** análoga do CI-994, a molécula **(II)** análoga do MS-275, BRD4884 (WAGNER *et al.*, 2015) e ACY-957, e seus respectivos IC₅₀.

Tabela 2. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos **(I)**, **(II)**, BRD4884 e ACY-957 em µM.

Moléculas	HDAC-1 (IC ₅₀)	HDAC-2 (IC ₅₀)	HDAC-3 (IC ₅₀)	HDAC 3 –8 (IC ₅₀)
 (I)	0.02	0.1	-	> 20
 (II)	0.04	0.1		> 20
 BRD4884	0.029	0.062	1.09	-
 ACY-957	0.007	0.018	1.3	>20 (HDAC-4,5, 7 e 9)

Através da Tabela 2, é possível observar um aumento significativo tanto na atividade inibitória quanto na seletividade das moléculas que são capazes de ocupar a cavidade interna do sítio ativo, principalmente quando se analisa a molécula BRD4884 e ACY-957. De maneira geral, os inibidores de HDAC compartilham algumas características estruturais como, por exemplo: a) presença de

um grupo ligante responsável pela coordenação com o átomo de zinco do sítio catalítico; b) cadeia hidrofóbica responsável por ocupar uma longa e estreita cadeia em forma tubular; c) presença de um grupo de reconhecimento superficial responsável por reconhecer e interagir com os resíduos de aminoácidos presentes na ‘entrada’ do sítio ativo das HDACs (CAI *et al.*, 2015) e, por fim, d) subunidade responsável por ocupar a cavidade interna.

1.3.4. Inibidores de HDACs na indução da expressão de gama-globina

Em 2010, Bradner e colaboradores desenvolveram um sistema de *high-throughput screening* que seria capaz de detectar a expressão de sete diferentes tipos de mRNA de globinas em células CD34⁺ utilizando microesferas fluorescentes. Inicialmente, foi realizado um *screening* com pequenas moléculas que identificaram um grupo de inibidores de HDAC, como os compostos com maior capacidade de indução de γ -globina. No estudo subsequente de correlação, foi percebido que inibidores de HDAC-1 e HDAC-2, da Classe I, eram os responsáveis pelo silenciamento do gene da γ -globina e seriam, então, importantes alvos para a indução da expressão desse gene (BRADNER, 2010a). Os compostos CI-994, MS-275 e MGCD-0103 demonstraram correlação entre inibição da HDAC e indução de γ -globina. A 1 μ M, CI-994 foi capaz de aumentar a razão γ/β mRNA em 1,3 vezes, enquanto MGCD-0103 aumentou essa razão em 1.6 vezes e MS-275 em 1.5 vezes. O mais potente inibidor de HDAC, MGCD-0103, também demonstrou-se como o mais promissor indutor de expressão de γ -globina (BRADNER, 2010).

A Acetylon Pharmaceuticals desenvolveu e avaliou uma biblioteca de inibidores de HDAC-1 e HDAC-2, chegando à estrutura do composto promissor ACY-957 (Tabela 2). Ensaios *in vitro* conduzidos por Shearstone e colaboradores demonstraram que este composto apresentou IC₅₀ de 7 nM contra HDAC-1 e 18 nM contra HDAC-2 quando avaliado em enzimas isoladas, e IC₅₀ de 304 nM contra HDAC-2 quando avaliado em CD34⁺ (SHEARSTONE *et al.*, 2012). Essa molécula foi capaz de aumentar o mRNA de γ -globina em 3,5 vezes à 1 μ M e aumento o número de células positivas para HbF em 2-3 vezes, ao mesmo tempo em que foi capaz de reduzir a expressão dos genes das globinas δ e β . Em células oriundas de pacientes falciformes, o ACY-957 aumentou a expressão da γ -globina de 12 para 58% (SHEARSTONE *et al.*, 2016). Devido ao sucesso do tratamento das células CD34⁺ com este composto, a empresa seguiu os estudos para modelos *in*

vivo em ratos e macacos. Resultados do segundo modelo mostraram que tratamento com 25 ou 75 mg/kg do composto diariamente por cinco dias foi capaz de aumentar a expressão da γ -globina em até 2,2 e 7,2 vezes, respectivamente (SHEARSTONE *et al.*, 2015). Esses resultados demonstram que a utilização de inibidores seletivos de HDAC-1 e HDAC-2 são promissores para o tratamento da anemia falciforme via indução de γ -globina.

Atualmente, têm sido publicados inúmeros papers na literatura discutindo-se a aplicação de uma nova tecnologia na área de desenvolvimento de fármacos: a degradação de proteínas (BÉKÉS *et al.*, 2022). Na última década tem crescido exponencialmente o interesse por essa tecnologia e se tornou um “hot topic” dentro da química medicinal. Nos últimos anos, apenas no PUBMED, mais de 1400 artigos foram publicados relacionados ao tema. A degradação de proteínas via utilização de Proteolysis Targeting Chimera (PROTACs) tem sido vista como uma solução para os obstáculos que existem na utilização de inibidores, como por exemplo o fato de que apenas se é possível desenhar inibidores para proteínas que apresentem sítio ativo, ou seja, enzimas, o que faz com que proteínas estruturais e fatores de transcrição não estejam no escopo dos alvos selecionados para trabalho (SAMARASINGHE; CREWS, 2021). Esse panorama tem sido transformado com o desenvolvimento da tecnologia de degradação de proteínas.

Sendo assim, devido ao crescente interesse por essa abordagem para o desenvolvimento de novos fármacos, decidiu-se neste trabalho explorar não apenas o desenvolvimento de novos inibidores de HDACs 1 e 2, mas também a aplicação do sistema de PROTACs para a degradação das HDACs 1 e 2. Os aspectos gerais e mecanismo de ação das PROTACs serão apresentados e discutidos a seguir.

1.4. PROTACs

1.4.1. Aspectos gerais e mecanismo de ação

De forma geral, PROTACs são moléculas heterobifuncionais capazes de ancorar em uma enzima denominada E3-ligase e em uma proteína de interesse, simultaneamente, levando a poliubiquitinação e degradação da proteína de interesse. Estruturalmente falando, a PROTAC apresenta três componentes estruturais básicos: a) um ligante da proteína de interesse; b) ligante de E3 ligase e c) um espaçador.

E3-ligases são enzimas que participam do ciclo catalítico de ubiquitinação de proteínas, as quais serão reconhecidas pelo proteossoma e degradadas. O sistema ubiquitina-proteossoma é um mecanismo intracelular primário para destruição de proteínas danificadas ou que não são mais necessárias (AMM *et al.*, 2014). A Figura 13 apresenta o ciclo de ubiquitinação de proteínas.

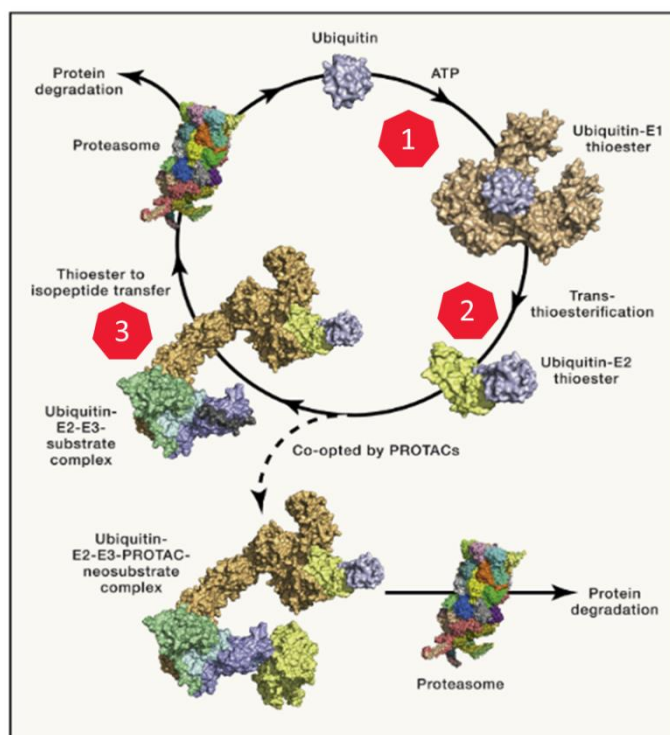


Figura 13. Ciclo de ubiquitinação de proteínas

Fonte: Figura retirada e adaptada de (BURSLEM; CREWS, 2020)

Na primeira etapa, a molécula livre de ubiquitina é ativada pela enzima E1 através da conversão do C-terminal a um tioester. Em seguida, uma reação de transesterificação transfere a molécula de ubiquitina da enzima E1 para a enzima E2. Por fim, o complexo E2-E3 vai ser o responsável pela transferência da ubiquitina para uma molécula de lisina presente na proteína que deverá ser reconhecida pelo proteossoma e degradada (BURSLEM; CREWS, 2020). Existem mais de 600 enzimas E3-ligases descritas na literatura, porém apenas duas delas tem sido amplamente utilizadas até o momento para utilização no sistema PROTAC: cereblon e a Von Hippel-Lindau (VHL) (SAMARASINGHE; CREWS, 2021). Talidomida e derivados são conhecidos ligantes de cereblon e tem sido utilizados para o sistema PROTAC, assim como foi desenvolvido um ligante de VHL para tal função (BUCKLEY *et al.*, 2012).

O objetivo das PROTACs é utilizar desse sistema celular para o direcionamento da degradação para proteínas que sejam de interesse farmacêutico. Por serem capazes de se dissociar dos alvos após a ubiquitinação, as PROTACs apresentam um mecanismo de ação catalítico, sendo assim tem potencial para ser utilizada em pequenas doses. A Figura 14 apresenta o mecanismo de ação das PROTACs.

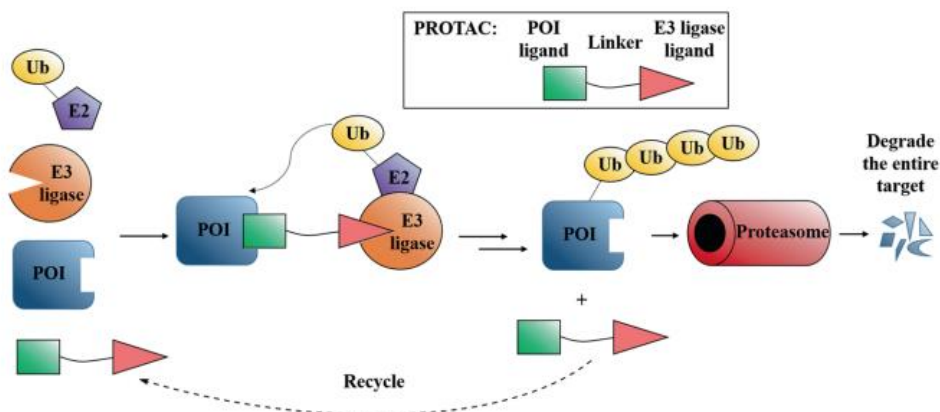


Figura 14. Mecanismo de ação das PROTACs

Fonte: Figura retirada de (SUN *et al.*, 2019)

Como visto na Figura 14, a molécula de PROTAC é capaz de interagir com a E3-ligase e a proteína de interesse (POI) simultaneamente, o que resulta na formação de um complexo ternário entre E3-ligase e a POI. Sendo assim, a PROTAC é capaz de direcionar a ubiquitinação realizada pela E3-ligase para a proteína de interesse do estudo. Após a poliubiquitinação, a proteína será reconhecida pelo proteossoma e degradada.

Já foi descrito na literatura a síntese e avaliação de PROTACs baseadas na estrutura do CI-994. Talidomida e VHL foram utilizados como ligantes de E3-ligase. A fusão das duas subunidades foi realizada utilizando-se espaçadores contendo uma cadeia alifática de 6 e 12 carbonos. Nesse trabalho, as PROTACs apresentaram valores de IC_{50} de 16,8 e 0,8 μM contra o complexo LSD1-CoREST-HDAC1, sendo que os maiores valores de IC_{50} resultantes dos espaçadores mais longos. Curiosamente, o ensaio celular para quantificação de acetilação da lisina H3K56 demonstrou que os compostos com maiores valores de IC_{50} apresentaram os maiores níveis de acetilação, o que pode ser explicado pelo fato desses compostos apresentarem cadeias alifáticas mais longas, sendo assim, provavelmente melhor perfil de permeabilidade. O mesmo perfil de resultado foi

visualizado em relação à degradação das HDAC 1-3, sendo o composto com espaçador mais longo o mais promissor em relação à degradação das enzimas (SMALLEY *et al.*, 2020). A Figura 15 apresenta a estrutura química das PROTACs 1-4 e o resultado obtido em relação à degradação das HDACs 1-3.

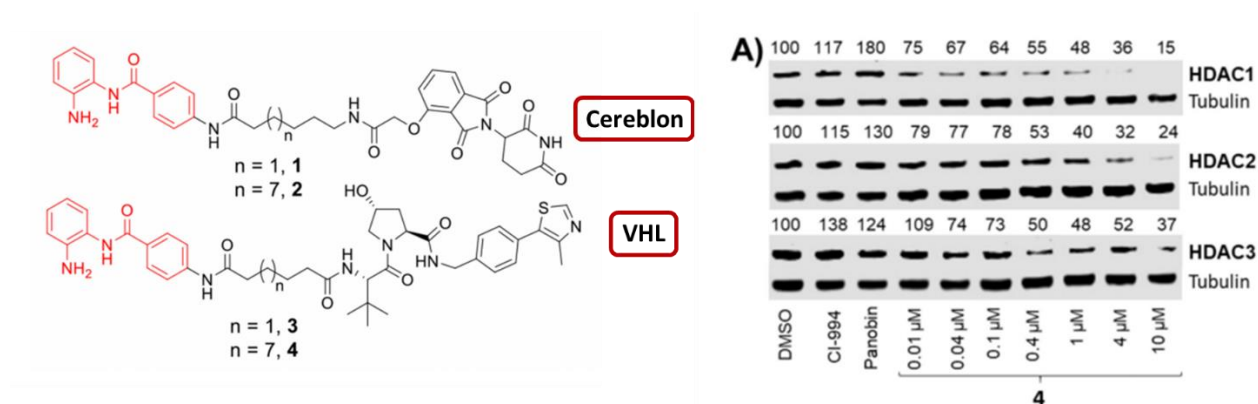


Figura 15. Estrutura das PROTACs 1-4 e Western blot da avaliação da degradação das HDACs 1-3.

Fonte: Figura retirada e adaptada de (SMALLEY *et al.*, 2020)

Verheul e colaboradores publicaram uma interessante revisão demonstrando que a regulação epigenética da HbF envolve uma série de alvos enzimáticos que podem ser utilizadas como alvo para degradação via PROTAC. Porém, até o momento, ainda não existe na literatura nenhum trabalho sobre a investigação da indução de expressão de γ -globina da degradação de HDACs através da utilização de PROTACs (THIJS *et al.*, 2020).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram planejados, sintetizados e caracterizados novos inibidores seletivos contra HDAC-1 e 2 além das PROTACs inéditas para degradação das mesmas enzimas, com o objetivo de avaliá-los como novos indutores de expressão de γ -globina e analisar a aplicação dos mesmos como candidatos ao tratamento da anemia falciforme. Para os inibidores de HDAC, foram obtidos vinte e quatro intermediários e sete produtos finais inéditos ((**18**), (**19**), (**20**), (**21**), (**29**), (**30**), e (**31**)) com rendimentos que variaram entre 29 e 85%, enquanto em relação às PROTACs foram obtidos quarenta intermediários e treze produtos finais (**ARP-20**, **ARP-25**, **ARP-26**, **ARP-27**, **ARP-37**, **ARP-39**, **ARP-42**, **ARP-47**, **ARP-49**, **ARP-53**, **ARP-54**, **ARP-56** e **ARP-58**) com rendimentos que variaram entre 30 e 93%.

Em relação aos inibidores de HDAC, foram obtidos dois compostos promissores (**21**) e (**31**) que apresentaram valores de IC_{50} contra HDAC-1 de 17 nM e 95 nM, respectivamente, e contra HDAC-2 de 39 nM e 940 nM, respectivamente. Quando avaliados contra outras HDACs da mesma classe e HDACs de outras classes, ambas as estruturas apresentaram baixos valores de inibição, o que indica a seletividade desses compostos contra as enzimas alvo deste trabalho. Em relação à avaliação da viabilidade celular, todos os compostos apresentaram células viáveis em níveis próximos a 80%, indicando inicialmente baixa toxicidade desses compostos quando utilizados em células K562. Dados preliminares sugerem que o maior índice de expressão de γ -globina alcançado foi entre 6 e 7 vezes de aumento para ambos os compostos e foi atingido na concentração de 1 μ M, modificando-se apenas o tempo de tratamento, sendo 72h para o composto (**21**) e 96h para o composto (**31**).

Todas as PROTACs obtidas foram avaliadas quanto aos níveis de degradação de HDAC-1-3 e acetilação da lisina H3K56Ac. Destacaram-se os compostos **ARP-26**, **ARP-37** e **ARP-49** com níveis de degradação de HDAC-1 que variou entre 40 e 60% e apresentaram os seguintes espaçadores: treze átomos sendo uma cadeia alifática composta por doze carbonos e ligação amida para conexão entre o espaçador e o inibidor de HDAC (**ARP-26**); anel alifático com ligação de amida conectando o espaçador ao inibidor de HDAC (**ARP-37** e **ARP-49**). O composto **ARP-49** apresenta o anel 4-fluorofenila na subunidade do inibidor de HDAC. Com esses resultados foi possível

concluir que, de forma geral, os compostos que apresentaram algum nível de degradação de proteína, o mesmo apresentava tendência de seletividade em relação à HDAC-1, o que ficou mais evidente com os compostos citados. Além disso, foi possível concluir também que ligações amina na conexão entre espaçador e inibidor não foram promissoras.

Por fim, conclui-se que neste trabalho foi possível a obtenção de inibidores seletivos contra HDAC-1 e 2, sendo o composto (**31**) dez vezes mais seletivo contra HDAC-1, quando comparada a HDAC-2, resultado ainda não antes publicado para compostos inibidores de HDAC utilizados para indução de γ -globina. Além disso, os compostos (**21**) e (**31**) alcançaram níveis de indução de γ -globina mais altos do que os apresentados pelo fármaco utilizado na terapia atualmente, evidenciando-os como excelentes candidatos para continuação dos estudos para torná-los candidatos a fármacos para o tratamento da AF. Em relação às PROTACs, os resultados obtidos neste trabalho são inéditos na literatura em relação à degradação à HDAC-1, o que os torna excelentes candidatos à avaliação dos mesmos quanto à indução de γ -globina e o entendimento da aplicação desta tecnologia para o tratamento da AF.

7. REFERÊNCIAS

ABDULMALIK, O.; PAGARE, P. P.; HUANG, B.; XU, G. G.; GHATGE, M. S.; XU, X.; CHEN, Q.; ANABARAONYE, N.; MUSAYEV, F. N.; OMAR, A. M.; VENITZ, J.; ZHANG, Y.; SAFO, M. K. VZHE-039, a novel antisickling agent that prevents erythrocyte sickling under both hypoxic and anoxic conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

ABID, S.; KEBE, K.; HOUSSAÏNI, A.; TOMBERLI, F.; MARCOS, E.; BIZARD, E.; BREAU, M.; PARPALEIX, A.; TISSOT, C. M.; MAITRE, B.; LIPSKAIA, L.; DERUMEAUX, G.; BASTIA, E.; MEKONTSO-DESSAP, A.; ADNOT, S. New Nitric Oxide Donor NCX 1443: Therapeutic Effects on Pulmonary Hypertension in the SAD Mouse Model of Sickle Cell Disease. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 283–292, 2018.

ABU-SALAH, K. M.; GAMBO, A. H. A. An analysis of the mechanism by which cetiedil inhibits sickling. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1003–1011, 2002.

AMM, I.; SOMMER, T.; WOLF, D. H. Protein quality control and elimination of protein waste: The

role of the ubiquitin-proteasome system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 1, p. 182–196, 2014.

ATAGA, K. I.; KUTLAR, A.; KANTER, J.; LILES, D.; CANCADO, R.; FRIEDRISCH, J.; GUTHRIE, T. H.; KNIGHT-MADDEN, J.; ALVAREZ, O. A.; GORDEUK, V. R.; GUALANDRO, S.; COLELLA, M. P.; SMITH, W. R.; ROLLINS, S. A.; STOCKER, J. W.; ROTHER, R. P. Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 5, p. 429–439, 2017.

BÉKÉS, M.; LANGLEY, D. R.; CREWS, C. M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 3, p. 181–200, 2022.

BEMIS, T. A.; LA CLAIR, J. J.; BURKART, M. D. Unraveling the Role of Linker Design in Proteolysis Targeting Chimeras. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 8042–8052, 2021.

BIELIAUSKAS, A. V.; KAY, M.; PFLUM, H. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 1402–1413, 2008.

BLAIR, H. A. Crizanlizumab: First Approval. **Drugs**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 79–84, 2020.

BLYDEN, G.; BRIDGES, K. R.; BRONTE, L. Case series of patients with severe sickle cell disease treated with voxelotor (GBT440) by compassionate access. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 8, p. E188–E190, 2018.

BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 769–784, 2006.

BRADNER, J. E.; MAK, R.; TANGUTURI, S. K.; MAZITSCHKE, R.; HAGGARTY, S. J.; ROSS, K.; CHANG, C. Y.; BOSCO, J.; WEST, N.; MORSE, E.; LIN, K.; SHEN, J. P.; KWIATKOWSKI, N. P.; GHELDOLF, N.; DEKKER, J.; DEANGELO, D. J.; CARR, S. A.; SCHREIBER, S. L.; GOLUB, T. R.; EBERT, B. L. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 107, p. 12617–12622, 2010.

BRADNER, James E.; MAK, R.; TANGUTURI, S. K.; MAZITSCHKE, R.; HAGGARTY, S. J.; ROSS, K.; CHANG, C. Y.; BOSCO, J.; WEST, N.; MORSE, E.; LIN, K.; SHEN, J. P.; KWIATKOWSKI, N. P.; GHELDOLF,

N.; DEKKER, J.; DEANGELO, D. J.; CARR, S. A.; SCHREIBER, S. L.; GOLUB, T. R.; EBERT, B. L. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12617–12622, 2010.

BRIEHL, R. W. Rheology of hemoglobin S gels: possible correlation with impaired microvascular circulation. **American Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v. 5, p. 390–398, 1983.

BROWNSEY, D. K.; ROWLEY, B. C.; GOROBETS, E.; GELFAND, B. S.; DERKSEN, D. J. Rapid synthesis of pomalidomide-conjugates for the development of protein degrader libraries. **Chemical Science**, v. 12, n. 12, p. 4519–4525, 2021.

BRUGNARA, C.; GEE, B.; ARMSBY, C. C.; KURTH, S.; SAKAMOTO, M.; RIFAI, N.; ALPER, S. L.; PLATT, O. S. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 5, p. 1227–1234, 1996.

BUCKLEY, D. L.; VAN MOLLE, I.; GAREISS, P. C.; TAE, H. S.; MICHEL, J.; NOBLIN, D. J.; JORGENSEN, W. L.; CIULLI, A.; CREWS, C. M. Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 α interaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 10, p. 4465–4468, 2012.

BURSLEM, G. M.; CREWS, C. M. Proteolysis Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. **Cell**, v. 181, p. 102–114, 2020.

BUTLER, K. V.; KOZIKOWSKI, A. P. Chemical origins of isoform selectivity in histone deacetylase inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 505–528, 2008.

CAI, J.; WEI, H.; HONG, K. H.; WU, X.; CAO, M.; ZONG, X.; LI, L.; SUN, C.; CHEN, J.; JI, M. Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 1–13, 2015.

CANALLI, A. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric

oxide donation. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 605–609, 2008.

CARR, B. I.; RAHBAR, S.; ASMERON, Y.; RIGGS, A.; WINBERG, C. D. Carcinogenicity and haemoglobin synthesis induction by cytidine analogues. **British Journal of Cancer**, v. 57, n. 4, p. 395–402, 1988.

CARR, B. I.; REILLY, J. G.; SMITH, S. S.; WINBERG, C.; RIGGS, A. The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat. **Carcinogenesis**, v. 5, p. 1583–1590, 1984.

CHAKRAVORTY, S.; WILLIAMS, T. N. Sick cell disease: A neglected chronic disease of increasing global health importance. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, n. 1, p. 48–53, 2015.

COKIC, V. P.; SMITH, R. D.; BELESLIN-COKIC, B. B.; NJOROGI, J. M.; MILLER, J. L.; GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal Clinical Investigation**, v. 111, p. 231–239, 2003.

CONITEC. **MEDICAMENTOS para o tratamento de Doença Falciforme**. Brasil: 2022.

DASTMALCHI, S. .; HAMZEH-MIVEHROUD, M.; SOKOUTI, B. Applied Case Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design. **Hershey PA: Medical Information Science Reference**, 2016.

DESIMONE, J.; HELLER, P.; HALL, L.; ZWIERS, D. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 14 I, p. 4428–4431, 1982.

DESIMONE, J.; KOSHY, M.; DORN, L.; LAVALLE, D.; BRESSLER, L.; MOLOKIE, R.; TALISCHY, N. Maintenance of elevated fetal hemoglobin levels by decitabine during dose interval treatment of sickle cell anemia. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 3905–3908, 2002.

DI MICCO, Simone; CHINI, M. G.; TERRACCIANO, S.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; BIFULCO, G. Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3795–3807, 2013.

DI MICCO, S.; CHINI, M. G.; TERRACCIANO, S.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; BIFULCO, G. Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 21,

p. 3795–3807, 2013.

DO NASCIMENTO, A. J.; HENNEBERG, R.; OTUKI, M. F.; FURMAN, A. E. F.; HERMANN, P.; LEONART, M. S. S. Protective effect of favonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 52–55, 2013.

DOVER, G. J.; BRUSILOW, S.; CHARACHE, S. Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. **Blood**, v. 84, p. 339–343, 1994.

DUFU, K.; PATEL, M.; OKSENBERG, D.; CABRALES, P. GBT440 improves red blood cell deformability and reduces viscosity of sickle cell blood under deoxygenated conditions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 70, n. 1, p. 95–105, 2018.

DULMOVITS, B. M.; APPIAH-KUBI, A. O.; PAPOIN, J.; HALE, J.; HE, M.; AL-ABED, Y.; DIDIER, S.; GOULD, M.; HUSAIN-KRAUTTER, S.; SINGH, S. A.; CHAN, K. W. H.; VLACHOS, A.; ALLEN, S. L.; TAYLOR, N.; MARAMBAUD, P.; AN, X.; GALLAGHER, P. G.; MOHANDAS, N.; LIPTON, J. M.; LIU, J. M.; BLANC, L. Pomalidomide reverses γ -globin silencing through the transcriptional reprogramming of adult hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 127, p. 1481–1492, 2016.

EATON, W. A. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 2, p. 205–211, 2020.

ESRICK, E. B.; MCCONKEY, M.; LIN, K.; FRISBEE, A.; EBERT, B. L. Inactivation of HDAC1 or HDAC2 induces gamma globin expression without altering cell cycle or proliferation. **American Journal Hematology**, v. 90, p. 624–628, 2015.

ESTIU, G.; GREENBERG, E.; HARRISON, C. B.; KWIATKOWSKI, N. P.; MAZITSCHK, R.; BRADNER, J. E.; WIEST, O. Structural origin of selectivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2898–2906, 2008.

FIBACH, E.; PRUS, E.; BIANCHI, N.; ZUCCATO, C.; BREVEGLIERI, G.; SALVATORI, F.; FINOTTI, A.; DI PAOLA, M. L.; BROGNARA, E.; LAMPRONTI, I.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R. Resveratrol: Antioxidant activity and induction of fetal hemoglobin in erythroid cells from normal donors and

β -thalassemia patients. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 29, n. 6, p. 974–982, 2012.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: Old discoveries, new concepts, and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 850–58, 2007.

FRIESNER, R. A.; MURPHY, R. B.; REPASKY, M. P.; FRYE, L. L.; GREENWOOD, J. R.; HALGREN, T. A.; SANSCHAGRIN, P. C.; MAINZ, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein - Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6177–6196, 2006.

GOPALSAMY, A.; AULABAUGH, A. E.; BARAKAT, A.; BEAUMONT, K. C.; CABRAL, S.; CANTERBURY, D. P.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CHANG, J. S.; CHEN, M. Z.; CHOI, C.; DOW, R. L.; FADEYI, O. O.; FENG, X.; FRANCE, S. P.; HOWARD, R. M.; JANZ, J. M.; JASTI, J.; JASUJA, R.; JONES, L. H.; KING-AHMAD, A.; KNEE, K. M.; KOHRT, J. T.; LIMBERAKIS, C.; LIRAS, S.; MARTINEZ, C. A.; MCCLURE, K. F.; NARAYANAN, A.; NARULA, J.; NOVAK, J. J.; O'CONNELL, T. N.; PARIKH, M. D.; PIOTROWSKI, D. W.; PLOTNIKOVA, O.; ROBINSON, R. P.; SAHASRABUDHE, P. V.; SHARMA, R.; THUMA, B. A.; VASA, D.; WEI, L.; WENZEL, A. Z.; WITHKA, J. M.; XIAO, J.; YAYLA, H. G. PF-07059013: A Noncovalent Modulator of Hemoglobin for Treatment of Sick Cell Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 326–342, 2021.

HAMBLETT, C. L.; METHOT, J. L.; MAMPREIAN, D. M.; SLOMAN, D. L.; STANTON, M. G.; KRAL, A. M.; FLEMING, J. C.; CRUZ, J. C.; CHENARD, M.; OZEROVA, N.; HITZ, A. M.; WANG, H.; DESHMUKH, S. V.; NAZEF, N.; HARSCH, A.; HUGHES, B.; DAHLBERG, W. K.; SZEWCZAK, A. A.; MIDDLETON, R. E.; MOSLEY, R. T.; SECRIST, J. P.; MILLER, T. A. The discovery of 6-amino nicotinamides as potent and selective histone deacetylase inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5300–5309, 2007.

HARRINGTON, D. J.; ADACHI, K.; ROYER, W. E. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 398–407, 1997.

HEBBEL, R. P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions. **Societe francaise de transfusion sanguine**, v. 15, p. 8–14, 2008.

HEBBEL, R. P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 83–86, 1997.

HOWARD, J.; HEMMAWAY, C. J.; TELFER, P.; LAYTON, D. M.; PORTER, J.; AWOGBADE, M.; MANT, T.; GRETHER, D. D.; DUFU, K.; HUTCHALEELAHA, A.; PATEL, M.; SIU, V.; DIXON, S.; LANDSMAN, N.; TONDA, M.; LEHRER-GRAIWER, J. A phase 1/2 ascending dose study and open-label extension study of voxelotor in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 133, n. 17, p. 1865–1875, 2019.

HUANG, J.; HADIMANI, S. B.; RUPON, J. W.; BALLAS, S. K.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Iron nitrosyl hemoglobin formation from the reactions of hemoglobin and hydroxyurea. **Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 2466–2474, 2002.

HUANG, J.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 3495–3501, 2004.

HUANG, J.; SOMMERS, E. M.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 13, p. 3473–3480, 2002.

HUTCHALEELAHA, A.; PATEL, M.; WASHINGTON, C.; SIU, V.; ALLEN, E.; OKSENBERG, D.; GRETHER, D. D.; MANT, T.; LEHRER-GRAIWER, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of voxelotor (GBT440) in healthy adults and patients with sickle cell disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 1290–1302, 2019.

IBRAHIM, H. S.; ABDELSALAM, M.; ZEYN, Y.; ZESSIN, M.; MUSTAFA, A. H. M.; FISCHER, M. A.; ZEYEN, P.; SUN, P.; BÜLBÜL, E. F.; VECCHIO, A.; ERDMANN, F.; SCHMIDT, M.; ROBAA, D.; BARINKA, C.; ROMIER, C.; SCHUTKOWSKI, M.; KRÄMER, O. H.; SIPPL, W. Synthesis, Molecular Docking and Biological Characterization of Pyrazine Linked 2-Aminobenzamides as New Class I Selective Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors with Anti-Leukemic Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 1–34, 2022.

INCALZA, M. A.; D'ORIA, R.; NATALICCHIO, A.; PERRINI, S.; LAVIOLA, L.; GIORGINO, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.

INGRAM, V. M. A Specific Chemical Difference Between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anemia Hæmoglobin. **Nature**, v. 178, p. 792–794, 1956.

ITOH, Y.; SUZUKI, T.; MIYATA, N. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 529–544, 2008.

JOHNSTONE, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nature Review Drug Discovery**, v. 1, p. 287–299, 2002.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; SMITH, W. R.; PANEPINTO, J. A.; WEATHERALL, D. J.; COSTA, F. F.; VICHINSKY, E. P. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, 2018.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.

KOSHY, M.; DORN, L.; BRESSLER, L.; MOLOKIE, R.; LAVELLE, D.; TALISCHY, N.; HOFFMAN, R.; VAN OVERVELD, W.; DESIMONE, J. 2-Deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2379–2384, 2000.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, p. 693–705, 2007.

KUTLAR, A.; KANTER, J.; LILES, D. K.; ALVAREZ, O. A.; CANÇADO, R. D.; FRIEDRISCH, J. R.; KNIGHT-MADDEN, J. M.; BRUEDERLE, A.; SHI, M.; ZHU, Z.; ATAGA, K. I. Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: A SUSTAIN study analysis. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 1, p. 55–61, 2019.

KUTLAR, A.; REID, M. E.; INATI, A.; TAHER, A. T.; ABBOUD, M. R.; EL-BESHLAWY, A.; BUCHANAN, G. R.; SMITH, H.; ATAGA, K. I.; PERRINE, S. P.; GHALIE, R. G. A dose-escalation phase IIa study of 2,2-dimethylbutyrate (HQQ-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 88, p. 255–260, 2013.

LANARO, C.; PENTEADO, C. F. F.; ALBUQUERQUE, D. M.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 235–242, 2009.

LAVELLE, D.; CHIN, J.; VAITKUS, K.; REDKAR, S.; PHIASIVONGSA, P.; TANG, C.; WILL, R.; HANKEWYCH, M.; ROXAS, B.; SINGH, M.; SAUNTHARARAJAH, Y.; DESIMONE, J. Oral decitabine reactivates expression of the methylated γ -globin gene in Papio anubis. **American Journal of Hematology**, v. 82, n. 11, p. 981–985, 2007.

LUBECK, D.; AGODOA, I.; BHAKTA, N.; DANESE, M.; PAPPU, K.; HOWARD, R.; GLEESON, M.; HALPERIN, M.; LANZKRON, S. Estimated Life Expectancy and Income of Patients With Sickle Cell Disease Compared With Those Without Sickle Cell Disease. **Journal of the American Medical Association network open**, v. 2, n. 11, p. e1915374, 2019.

LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251–260, 1998.

MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E. ANCHUSTEGUI, M. MALAVÉ, H.; ARENDS, T. Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematologica**, v. 90, p. 172–176, 1993.

METHOT, J. L.; HAMBLETT, C. L.; MAMPREIAN, D. M.; JUNG, J.; HARSCH, A.; SZEWCZAK, A. A.; DAHLBERG, W. K.; MIDDLETON, R. E.; HUGHES, B.; FLEMING, J. C.; WANG, H.; KRAL, A. M.; OZEROVA, N.; CRUZ, J. C.; HAINES, B.; CHENARD, M.; KENIFIC, C. M.; SECRIST, J. P.; MILLER, T. A. SAR profiles of spirocyclic nicotinamide derived selective HDAC1/HDAC2 inhibitors (SHI-1:2). **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6104–6109, 2008.

MILLARD, C. J.; WATSON, P. J.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Targeting Class I histone deacetylases in a “complex” environment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, p. 363–377, 2017.

MORADEI, O. M.; MALLAIS, T. C.; FRECHETTE, S.; PAQUIN, I.; PIERRE, E.; LEIT, S. M.; FOURNEL, M.; BONFILS, C.; LIU, J.; YAN, T. P.; LU, A.; RAHIL, J.; WANG, J.; LEFEBVRE, S. Supporting Information:

Novel Aminophenyl Benzamide Type Histone Deacetylase Inhibitors with Enhanced Potency and Selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 5543–5546, 2007.

MOTA, F. M.; JÚNIOR, M. A. F.; POMPEO, C. M.; FROTA, O. P.; TSUHA, D. H.; SOUZA, A. S. de. Análise da tendência temporal da mortalidade por anemia falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem - REBEn**, v. 75, n. 4, p. 1–8, 2022.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O.; WYCHE, M. O. .; CASTRO, O. .; TAVAKKOLI, F. Upregulation of TNF_ by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 96, p. 14, 2000.

NIIHARA, Y. L-Glutamine Therapy Reduces Hospitalization for Sickle Cell Anemia and Sickle β^0 -Thalassemia Patients at Six Months – A Phase II Randomized Trial. **Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 1000116, 2014.

NIIHARA, Y.; MILLER, S. T.; KANTER, J.; LANZKRON, S.; SMITH, W. R.; HSU, L. L.; GORDEUK, V. R.; VISWANATHAN, K.; SARNAIK, S.; OSUNKWO, I.; GUILLAUME, E.; SADANANDAN, S.; SIEGER, L.; LASKY, J. L.; PANOSYAN, E. H.; BLAKE, O. A.; NEW, T. N.; BELLEVUE, R.; TRAN, L. T.; RAZON, R. L.; STARK, C. W.; NEUMAYR, L. D.; VICHINSKY, E. P. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease . **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 3, p. 226–235, 2018.

NIIHARA, Y.; ZEREZ, C. R.; AKIYAMA, D. S.; TANAKA, K. R. Oral L-glutamine therapy for sickle cell anemia: I. Subjective clinical improvement and favorable change in red cell NAD redox potential. **American Journal of Hematology**, v. 58, n. 2, p. 117–121, 1998.

OWUSU-ANSAH, A.; IHUNNAH, C. A.; WALKER, A. L.; OFORI-ACQUAH, S. F. Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. **Translational Research**, v. 15, p. 240–246, 2015.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543–548, 1949.

PAVAN, A. R.; DOS SANTOS, J. L. Advances in Sickle Cell Disease Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 1–24, 2021.

PAVAN, A. R.; LOPES, J. R.; DOS SANTOS, J. L. The state of the art of fetal hemoglobin-inducing agents. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, n. 11, p. 1279–1293, 2022.

PIEL, F. B.; PATIL, A. P.; HOWES, R. E.; NYANGIRI, O. A.; GETHING, P. W.; DEWI, M.; TEMPERLEY, W. H.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; HAY, S. I. Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, p. 142–151, 2013.

PINTO, A. C. S.; COSTA, F. F.; GUALANDRO, S. F. M.; FONSECA, P. B. B.; BUENO, C. T.; CANÇADO, R. D. Burden of Sickle Cell Disease: A Brazilian Societal Perspective Analysis. **Blood**, v. 136, p. 10–11, 2020.

PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M. H.; KLUG, P. P. Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1639–1644, 1994.

POONGAVANAM, V.; KIHLEBERG, J. PROTAC cell permeability and oral bioavailability: a journey into uncharted territory. **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 123–126, 2021.

QUINN, C. T.; SMITH, E. P.; ARBABI, S.; KHERA, P. K.; LINDSELL, C. J.; NISS, O.; JOINER, C. H.; FRANCO, R. S.; COHEN, R. M. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1195–1201, 2016.

REES, D. C.; BROUSSE, V. A. M.; BREWIN, J. N.; DEBR, R. Blood Reviews Determinants of severity in sickle cell disease. **Blood Reviews**, v. 56, n. June, p. 100983, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.100983>.

REID, M. E.; EL BESHAWY, A.; INATI, A.; KUTLAR, A.; ABBOUD, M. R.; HAYNES, J. J.; WARD, R.; SHARON, B.; TAHER, A. T.; SMITH, W.; MANWANI, D.; GHALIE, R. G. A double-blind, placebo-controlled phase II study of the efficacy and safety of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 89, p. 709–713, 2014.

SADAF, A.; QUINN, C. T. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn?. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 2, p. 146–154, 2020.

SAITO, A.; YAMASHITA, T.; MARIKO, Y.; NOSAKA, Y.; TSUCHIYA, K.; ANDO, T.; SUZUKI, T.; TSURUO,

T.; NAKANISHI, O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 96, p. 4592–4597, 1999.

SAMARASINGHE, K. T. G.; CREWS, C. M. Targeted Protein Degradation: A Promise for Undruggable Proteins. **Cell Chemical Biology**, v. 28, n. 7, p. 934–951, 2021.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, 2013.

SANKARAN, V. G.; WEISS, M. J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nature Medicine**, v. 21, p. 221–230, 2015.

SAUNTHARARAJAH, Y.; HILLERY, C. A.; LAVELLE, D.; MOLOKIE, R.; DORN, L.; BRESSLER, L.; GAVAZOVA, S.; CHEN, Y. H.; HOFFMAN, R.; DESIMONE, J. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 3865–3870, 2003.

SCHRÖDINGER. **Glide**. New York: 2017.

SCHRÖDINGER. **LigPrep**. New York: 2017.

SCHRÖDINGER. **Maestro**. New York: 2017.

SHEARSTONE, J. R.; CHONKAR, A.; BHOL, K.; JONES, S. S.; JARPE, M. The Histone Deacetylase 1 and 2 (HDAC1/2) Inhibitor ACY-957 Increases Epsilon (HbE) and Gamma (HbG) Globin mRNA in the Peripheral Blood of Non-Anemic Rats and Monkeys. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 3378, 2015.

SHEARSTONE, J. R.; GOLONZHKA, O.; CHONKAR, A.; TAMANG, D.; VAN DUZER, J. H.; JONES, S. S.; JARPE, M. B. Chemical Inhibition of Histone Deacetylases 1 and 2 Induces Fetal Hemoglobin through Activation of GATA2. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0153767, 2016.

SHEARSTONE, J. R.; VAN DUZER, J.; BRADNER, J. E.; MAZITSCHK, R.; JONES, S. S.; JARPE, M. Induction of Human Fetal Hemoglobin Expression by Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 1 and 2 (HDAC1/2). **Blood**, v. 120, n. 21, p. 3259, 2012.

SHI, L.; CUI, S.; ENGEL, J. D.; TANABE, O. Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for fetal hemoglobin induction. **Nature Medicine**, v. 19, p. 291–294, 2013.

SHI, Yujiang; LAN, F.; MATSON, C.; MULLIGAN, P.; WHETSTINE, J. R.; COLE, P. A.; CASERO, R. A.; SHI, Yang. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 941–53, 2004.

SMALLEY, J. P.; ADAMS, G. E.; MILLARD, C. J.; SONG, Y.; NORRIS, J. K. S.; SCHWABE, J. W. R.; COWLEY, S. M.; HODGKINSON, J. T. PROTAC-mediated degradation of class i histone deacetylase enzymes in corepressor complexes. **Chemical Communications**, v. 56, n. 32, p. 4476–4479, 2020.

SMALLEY, J. P.; BAKER, I. M.; PYTEL, W. A.; LIN, L. Y.; BOWMAN, K. J.; SCHWABE, J. W. R.; COWLEY, S. M.; HODGKINSON, J. T. Optimization of Class I Histone Deacetylase PROTACs Reveals that HDAC1/2 Degradation is Critical to Induce Apoptosis and Cell Arrest in Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 5642–5659, 2022.

STORCH, A. S.; MATTOS, J. D. de; ALVES, R.; GALDINO, I. dos S.; ROCHA, H. N. M. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262–273, 2017.

SUN, X.; GAO, H.; YANG, Y.; HE, M.; WU, Y.; SONG, Y.; TONG, Y.; RAO, Y. Protacs: Great opportunities for academia and industry. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 1, 2019.

THIAGALINGAM, S.; CHENG, K. H.; LEE, H. J.; MINEVA, N.; THIAGALINGAM, A.; PONTE, J. F. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 983, p. 84–100, 2003.

THIJS, T. C.; TRINH, V. T.; VÁZQUEZ, O.; PHILIPSEN, S. Targeted Protein Degradation as a Promising Tool for Epigenetic Upregulation of Fetal Hemoglobin. **ChemMedChem**, v. 15, n. 24, p. 2436–2443, 2020.

URIAS, B. S.; PAVAN, A. R.; ALBUQUERQUE, G. R.; PROKOPCZYK, I. M.; ALVES, T. M. F.; DE MELO, T. R. F.; SARTORI, G. R.; DA SILVA, J. H. M.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Dos. Optimization of Resveratrol Used as a Scaffold to Design Histone Deacetylase (HDAC-1 and HDAC-2) Inhibitors.

Pharmaceuticals, v. 15, n. 10, p. 1–14, 2022.

VAN DER PLOEG, L. H. T.; FLAVELL, R. A. DNA methylation in the human $\gamma\delta\beta$ -globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. **Cell**, v. 19, p. 947–958, 1980.

VEKILOV, P. G. Sick-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?. **British Journal of Haematology**, v. 139, n. 2, p. 173–184, 2007.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; STEINBACHER, S.; SCHOMBURG, A.; REINEMER, P.; GALE, J. P.; CAMPBELL, A. J.; FISHER, S. L.; ZHAO, W. N.; REIS, S. A.; HENNIG, K. M.; THOMAS, M.; MÜLLER, P.; JEFSON, M. R.; FASS, D. M.; HAGGARTY, S. J.; ZHANG, Y. L.; HOLSON, E. B. Kinetic and structural insights into the binding of histone deacetylase 1 and 2 (HDAC1, 2) inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4008–4015, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.040>.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; LEWIS, M. C.; HOLSON, E. B. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 589–604, 2013.

WAGNER, F. F.; ZHANG, Y. L.; FASS, D. M.; JOSEPH, N.; GALE, J. P.; WEIWER, M.; MCCARREN, P.; FISHER, S. L.; KAYA, T.; ZHAO, W. N.; REIS, S. A.; HENNIG, K. M.; THOMAS, M.; LEMERCIER, B. C.; LEWIS, M. C.; GUAN, J. S.; MOYER, M. P.; SCOLNICK, E.; HAGGARTY, S. J.; TSAI, L. H.; HOLSON, E. B. Kinetically selective inhibitors of histone deacetylase 2 (HDAC2) as cognition enhancers. **Chemical Science**, v. 6, n. 1, p. 804–815, 2015.

WANG, D. F.; WIEST, O.; HELQUIST, P.; LAN-HARGEST, H. Y.; WIECH, N. L. On the function of the 14 Å long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 3409–3417, 2004.

WILLIAMS, R.; OLIVI, S.; LI, C. S.; STORM, M.; CREMER, L.; MACKERT, P.; WANG, W. Oral glutamine supplementation decreases resting energy expenditure in children and adolescents with sickle cell anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, n. 10, p. 619–625, 2004.

ZENNADI, R.; CHIEN, A.; XU, K.; BATCHVAROVA, M.; TELEN, M. J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood**, v. 112, p. 3474–3483, 2008.

ZHANG, Q.; CHEN, C. Direct acylation of aryl amines using dimethylformamide and dimethylacetamide as the acyl resources. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 114–119, 2016.