

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 02/02/2020.

Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da  
pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme

ARARAQUARA  
2018

THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA – SP  
2018

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**M528s** Melo, Thais Regina Ferreira de Melo  
Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme / Thais Regina Ferreira de Melo. – Araraquara, 2018.  
ix, 152 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Anemia Falciforme. 2. Pomalidomida. 3. Doadores de óxido nítrico. 4. Sickle cell anemia.  
I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440  
**CAPES: 40300005**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Síntese e Avaliação Farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme

**AUTORA: THÁIS REGINA FERREIRA DE MELO**


**ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

  
Profa. Dra. CAROLINA LANARO  
Hemocentro da UNICAMP / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

  
Prof. Dr. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS  
Patologia Clínica / Universidade Estadual de Campinas

  
Prof. Dr. RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO  
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física - USP - São Carlos

  
Profa. Dra. JEANINE GIROLLA VARGAS  
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP

Araraquara, 02 de fevereiro de 2018

## DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Paulo e Célia e ao meu querido Miller*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e sabedoria e permitido concluir este trabalho.

Aos meus pais, Paulo e Célia por todo o apoio, força, amor e compreensão de sempre e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido parceiro Miller, que sempre me apoiou, incentivou e esteve presente na realização deste trabalho, por toda a ajuda, paciência, amor, carinho e dedicação em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pelo exemplo de dedicação e amor pela pesquisa que sempre me foram transmitidos com amizade, compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos da realização desse trabalho.

Aos amigos de laboratório, Daniela Hartmann Jornada, Diego Chiba, Guilherme Fernandes, Aline Pavan, Rafael Chelucci, Gabriela Albuquerque, Beatriz Urias, Mateus Grecco Paulo Renato Yamasaki Priscila Longhin Bosquesi, Marcella Gabrielle, Luiz Dutra, Juliana Reis por toda ajuda e por tornarem os dias de trabalho melhores e mais divertidos.

As minhas queridas amigas: Adriana, Amanda, Camila Cressoni, Camila Dalla Costa e Daniele, pela amizade de todos esses anos e por todo o apoio e incentivo.

A Carolina Lanaro pela ajuda e discussões dos ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Lionel Blanc, por ter me dado a oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório e aos colegas de laboratório Brian Dulmovits, Emily Hartman, Jimmy Hom e Julien Papoin do grupo The Feinstein Institute for Medical Research por me ensinarem tudo com muita paciência me proporcionando uma experiência maravilhosa de crescimento pessoal e profissional.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes durante esta jornada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro para manutenção e desenvolvimento do trabalho. Processo FAPESP: 2014/06755-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

## RESUMO

MELO, T. R. F. **Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme.** 2018. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

A Anemia Falciforme (AF) é uma anemia hemolítica genética caracterizada por uma mutação no gene da globina beta. Além do quadro vaso-oclusivo, os pacientes com AF apresentam processo inflamatório crônico caracterizado pelo aumento de diversas citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Atualmente, a hidroxiureia (HU) é o único fármaco disponível para o tratamento e seus efeitos benéficos estão associados ao óxido nítrico (NO), gerado após biotransformação. O NO desempenha efeitos benéficos na doença tais como: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e aumento na produção de hemoglobina fetal (HbF). Nesse contexto, foram sintetizados os compostos **3(a-b)**; **4(a-b)** e **5(a-b)** obtidos através da estratégia de hibridação molecular da subunidade inibidora de TNF- $\alpha$  presente na pomalidomida com o núcleo furoxânico (1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido) com propriedades doadores de NO. Os compostos sintetizados foram obtidos em rendimentos que variaram entre 13 e 30%. As moléculas do estudo demonstraram capacidade de liberar NO em níveis que variaram entre 1 e 30%. Em cultura de células CD34<sup>+</sup>, o composto **4b** (2,5  $\mu$ M) foi capaz de induzir globina  $\gamma$ , enquanto HU foi ativa apenas em concentrações 4 vezes superiores (10  $\mu$ M). Estudos preliminares do possível mecanismo de ação mostraram que o composto **4b** não interfere na expressão de fatores de transcrição a exemplo do BCL11A, IKAROS, LRF e nos níveis de acetilação de histona H3. O composto **4b** foi capaz de induzir o aumento dos níveis de monofostato de guanosina cíclico (GMPC) em células HUVEC e diminuir a produção de TNF- $\alpha$  em monócitos. Os resultados aqui obtidos sugerem que o composto **4b** seja um novo protótipo para o desenvolvimento de fármacos para anemia falciforme.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anemia Falciforme, pomalidomida, doadores de óxido nítrico



## ABSTRACT

MELO, T. R. F. **Synthesis and pharmacological evaluation of pomalidomide derivatives for the treatment of sickle cell anemia.** 2018. 161 f. Thesis (PhD in Pharmaceutical Sciences)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited hemolytic anemia characterized by a mutation in the  $\beta$ -globin gene. In addition to the vaso-occlusive condition, there is a chronic inflammatory process in the patients characterized by the increase of several pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ . Currently, hydroxyurea (HU) is the only drug available for treatment and its beneficial effects are associated with nitric oxide (NO), generated after biotransformation. NO has beneficial effects on the disease such as vasodilatation, inhibition of platelet aggregation and fetal hemoglobin (HbF) production. In this context, the compounds **3 (a-b)**, **4(a-b)** and **5(a-b)** were synthesized using molecular hybridization approach of the pomalidomide TNF- $\alpha$  inhibitor subunit with the furoxan ring (1,2,5-oxadiazol-2-*N*-oxide) as NO donor. Compounds were synthesized in yields ranging from 13 to 30%. The compounds demonstrated ability to release NO at levels ranging from 1 to 30%. In CD34+ cellular cultures, compound **4b** at 2.5  $\mu$ M concentration was able to induce  $\gamma$ -globin, while HU was active only at 4-fold higher concentrations (10  $\mu$ M). Preliminary studies of the mechanism of action have shown that compound **4b** does not interfere with transcription factors such as BCL11A, IKAROS, LRF and histone H3 acetylation levels. Our results indicate that, the mechanism of action of this compound differs from the parental drug pomalidomide. Compound **4b** also increased cGMP levels in HUVEC and CD34 + cells. For CD34 + cells, cGMP levels were comparable to that of HU. These results suggest that compound **4b** is a promising lead candidate for the development of drug candidates for treatment of SCA.

**Keywords:** Sickle cell anemia; pomalidomide; nitric oxide donors

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de globinas durante a vida fetal e adulta. ....	7
Figura 2. Fatores de transcrição reguladores da expressão de gama-globina.....	8
Figura 3. Fisiopatologia da anemia falciforme .....	10
Figura 4. Propriedades do NO nos vasos sanguíneos .....	11
Figura 5. Abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento da anemia falciforme.....	13
Figura 6: Equilíbrio tautomérico do furoxano.....	20
Figura 7. Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos. .	21
Figura 8. Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos (3a-b), (4a-b) e (5a-b) .....	26
Figura 9. Obtenção do intermediário furoxânico 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (2a) e intermediário 6.....	30
Figura 10.Obtenção dos intermediários (2b e 12) .....	32
Figura 11.Obtenção do intermediário (19) e do furoxano (2c).....	32
Figura 12.Obtenção dos intermediários 14-19 .....	33
Figura 13. Obtenção dos compostos híbridos finais (3a-b), (4a-b) e (5a-b).....	34
Figura 14: Expressão de proteínas da expressão de globinas em células CD34+ no 14 <sup>o</sup> dia. ....	55
Figura 15. Quantificação de hemoglobinas em células CD34+.....	56
Figura 16: Curvas de crescimento das culturas de precursores eritroides derivados de células CD34+.....	57
Figura 17. Diferenciação terminal dos precursores eritroide derivados de células CD34+.....	58
Figura 18. Citospins corados com May-Grunwald Giemsa mostrando a morfologia celular durante a diferenciação terminal celular das células CD34+.....	59
Figura 19. Western blot da expressão de BCL11A e IKAROS nas células CD34+ no 4 <sup>o</sup> dia tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM), composto 4b (2,5 µM).....	60
Figura 20. Western blot da expressão de LRF nas células CD34+.....	61
Figura 21. Western blot da expressão de histona H3 total nas células CD34+.....	61
Figura 22: Efeito do DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM), composto 4b (2,5 µM) nos níveis de GMPC.....	62
Figura 23. Viabilidade celular em monócitos utilizando DMSO, pomalidomida e diferentes concentrações do composto 4b.....	63
Figura 24. Concentração de TNF-alfa produzido por monócitos em meio contendo LPS (controle positivo), pomalidomida 5µM e composto 4b.....	63

Figura 25. Proposta de formação do derivado furoxânico 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido sugerida por TAKAYAMA; HANASAKI; IJICHI, 1996 .....	64
Figura 26. Mecanismo de formação do intermediário 6 .....	65
Figura 27. Mecanismo da reação de formação dos intermediários 14-19.....	68
Figura 28. Mecanismo de detecção de nitrito utilizando reagente de Griess .....	74
Figura 29. Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos com ataque em C3.....	76
Figura 30. Expressão de gama-globina mediada pela via GMPc-NO .....	80
Figura 31. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (2a) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	92
Figura 32. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (2a) (75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	93
Figura 33: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (6) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	94
Figura 34: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (6) (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	95
Figura 35: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido sulfonilfeniltioacético (9) (400 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	98
Figura 36: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de 3,4-bisaryl-sulfonilfuroxano (2b) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	99
Figura 37: Espectro na região do infravermelho do composto 12 ( pastilha de KBr) .....	101
Figura 38: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 12 (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....	102
Figura 39: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do intermediário 12 (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	103
Figura 40. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido (2c) (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....	105
Figura 41: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (2c) (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....	106
Figura 42: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (13) (300 MHz; $\text{DMSO}$ ).....	107
Figura 43: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (13) (75MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	108
Figura 44: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(2 aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (14) (300 MHz, $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	111
Figura 45: Espectro de RMN do 4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (14) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	112
Figura 46: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (15) (300 MHz, $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	114

Figura 47: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (15) (75 MHz, $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	115
Figura 48: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 3a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	118
Figura 49: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 3a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ...	119
Figura 50: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 3b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	121
Figura 51: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 3b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ...	122
Figura 52: Espectro de RMN HSQC do composto 3b (75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	123
Figura 53: Espectro de RMN HMBC do composto 3b (75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	124
Figura 54. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido ...	127
Figura 55: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (16) (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	128
Figura 56: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (17) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	130
Figura 57: Espectro de RMN $\text{C}^{13}$ 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (17)(75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	131
Figura 58: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (4a) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	134
Figura 59: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi) hidrazono) .....	135
Figura 60: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 4b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	137
Figura 61: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 4b (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	138
Figura 62: Espectro de massas de alta resolução do composto 4b. ....	139
Figura 63: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (18) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	141
Figura 64: Espectro de RMN $\text{C}^{13}$ 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (18) (75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	142
Figura 65: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ -(4-((2-(3-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (19) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	144
Figura 66: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -(4-((2-(3-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (19) (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	145
Figura 67: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 5a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	148
Figura 68: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 5a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	149
Figura 69: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 5b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	150
Figura 70. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 5b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	151
Figura 71: Espectro de massas de alta resolução do composto 5b .....	152

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 14 e 15. ....	42
Tabela 2. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 16 e 17. ....	43
Tabela 3. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 18 e 19. ....	43
Tabela 4. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 3a e 3b. ....	44
Tabela 5. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 4a e 4b. ....	44
Tabela 6. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 5a e 5b. ....	45
Tabela 7: Comparação dos deslocamentos das moléculas 14 e 3a no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	46
Tabela 8: Comparação dos deslocamentos das moléculas 15 e 3b no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	47
Tabela 9. Comparação dos deslocamentos das moléculas 16 e 4a no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	48
Tabela 10: Comparação dos deslocamentos das moléculas 17 e 4b no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	49
Tabela 11: Comparação dos deslocamentos das moléculas 18 e 5a no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	50
Tabela 12. Comparação dos deslocamentos das moléculas 19 e 5b no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	51
Tabela 13. Porcentagem de produção de nitrito pelos compostos na presença e ausência de cisteína $\pm$ E.P.M, (n=3). ....	53

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AF	Anemia Falciforme
ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
DBU	1,8-diazabicycloundec-7-eno
DCM	Diclorometano
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
EDC	Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Hb	Hemoglobina
HU	Hidroxiureia
IV	Espectrofotometria na região do infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NO	Óxido nítrico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
THF	Tetrahidrofurano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b>	<b>I</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>II</b>
<b>Resumo</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>V-VII</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>IX</b>
Introdução	1
Revisão bibliográfica	4
Objetivos	23
Material e Métodos	24
Resultados	41
Discussão	64
Conclusões	82
Referências	84
Apêndice	91

## 1 INTRODUÇÃO

A AF é uma das hemoglobinopatias genéticas mais prevalente no mundo (WEATHERALL, 2008). No Brasil no ano de 2016, foram diagnosticados 1.075 recém-nascidos com a doença falciforme e 60.418 portadores de traço falciforme, segundo dados do relatório anual do Programa Nacional de Triagem Neonatal (BRASIL, 2016).

A doença é caracterizada por uma mutação no sexto códon do gene da globina  $\beta$ , na qual ocorre uma troca de uma adenina por uma timina (GAG para GTG), resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na cadeia da globina  $\beta$  dando origem a hemoglobina anômala ( $\beta^s$ -globina) (BUNN, 1997).

A hemoglobina mutada (HbS) quando desoxigenada favorece a polimerização destas moléculas de HbS levando a alterações na estrutura e flexibilidade dos eritrócitos, promovendo desidratação celular, estresse físico e oxidativo, o que pode levar a hemólise destas células (STEINBERG, 2006).

A vaso-oclusão é decorrente da obstrução, principalmente da microcirculação, causada pelas células falciformes e pela maior adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular. Esse quadro pode levar a isquemia e infarto de diversos tecidos por uma perfusão tissular inadequada e ainda contribui para as crises dolorosas, disfunção dos órgãos, e em alguns casos, morte (MANWANI; FRENETTE, 2013a)

Foi relatado que pacientes com AF apresentam aumento significativo dos níveis circulantes de algumas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (LANARO et al., 2009). O aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em pacientes com AF contribui com as crises vaso-oclusivas, e pode levar ao aparecimento de episódios inflamatórios (CAJADO et al., 2010).



Assim, compostos que inibam essa citocina poderiam auxiliar na diminuição dos sintomas clínicos da doença.

Os fármacos talidomida, pomalidomida e lenalidomida são imidas imunomodulatórias com capacidade de reduzir os níveis circulantes de TNF- $\alpha$ . Estudos de relação estrutura química versus atividade biológica mostraram diferentes potências para estes fármacos. A pomalidomida, por exemplo, é cerca de 50.000 vezes mais potente que a talidomida na redução do TNF- $\alpha$  (CHAULET et al., 2011; MULLER et al., 1999). Além do controle do processo inflamatório, estudos demonstraram que a pomalidomida também foi capaz de induzir a produção de HbF em camundongos transgênicos para AF (MEILER et al., 2011).

Até o momento, não existe um tratamento específico para AF. Os fármacos disponíveis auxiliam no tratamento dos sintomas e visam melhorar a qualidade de vida do paciente. Além da glutamina, aprovada em 2017 como coadjuvante no tratamento, o único fármaco aprovado pela agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) é a hidroxiuréia (HU). Este fármaco tem capacidade de melhorar o fluxo nos vasos sanguíneos, reduzir a adesão celular ao endotélio e aumentar os níveis de HbF (CHARACHE et al., 1992). Além disso, estudos mostram que HU pode atuar como fonte exógena de óxido nítrico (NO) (COKIC et al., 2003; STEINBERG, 2006).

O NO exerce vários efeitos como, por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e da expressão de moléculas de adesão e estimula a produção de hemoglobina fetal (HbF) via guanilato ciclase solúvel (sGC) aumentando expressão de globina  $\gamma$  em células eritroleucêmicas (K562) e eritroblastos humanos primários (COKIC et al., 2003; CONRAN et al., 2004).

O aumento da HbF em pacientes com AF proporciona melhora nos sintomas clínicos e reduz as necessidades transfusionais e internações hospitalares (BAUER; ORKIN, 2015; PERRINE; PACE; FALLER, 2014; PLATT, 1994).

Assim, neste trabalho as estruturas foram planejadas visando à ação sinérgica de modulação da biossíntese de TNF- $\alpha$ , aumento dos níveis de NO e de HbF. Esta estratégia representa uma nova abordagem terapêutica e pode ser útil para desenvolvimento de novos compostos para o tratamento da AF.

## 7 CONCLUSÕES

Até presente momento, foram sintetizados 16 intermediários sintéticos com rendimentos variando entre 21% e 75%. Todos os compostos foram caracterizados por métodos analíticas que sugerem a obtenção desses compostos. Foram obtidos 6 produtos finais com rendimentos variando entre 13 e 30%.

No ensaio de doação de óxido nítrico foi possível observar que o mecanismo de doação para todos os compostos é cisteíno-dependente, uma vez que na ausência deste aminoácido a doação foi nula. Os compostos **4a-b** apresentaram maior capacidade de geração de nitrito entre os compostos da série, com valores variando entre 28 e 30%.

Os compostos finais **3b**, **4b**, e **5b** foram avaliados quanto a capacidade de induzir o aumento de produção de gobina  $\gamma$ . O composto **4b** foi o mais promissor, aumentando a expressão de gobina  $\gamma$  de maneira comparável a HU, porém com menor dose (2,5  $\mu$ M).

O mecanismo de indução de gobina  $\gamma$  pelo composto **4b** também foi investigado e aparentemente o mesmo atua por um mecanismo diferente da pomalidomida, uma vez que não está relacionado com BCL11A e IKAROS. Além disso, os níveis de LRF, um repressor do gene da gobina  $\gamma$  independente de BCL11A, também não foram alterados. Estudos envolvendo mecanismos epigenéticos com histonas foram iniciados, porém os dados não foram conclusivos.

O composto **4b** também foi capaz de aumentar a produção de GMPc nas células HUVEC e CD34<sup>+</sup> em quantidade comparável a HU, porém em menor dose.

Adicionalmente, o composto **4b** diminuiu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  em monócitos estimulados com LPS.

Os resultados obtidos até o presente momento caracterizam o novo composto **4b** sintetizados como protótipo potencialmente útil ao tratamento da anemia falciforme.

## REFERÊNCIAS

- AERBAJINAI, W. et al. Thalidomide induces gamma-globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2864–2871, 2007.
- AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19–27, 2011.
- ATZ A. M.; WESSEL D. L. Inhaled Nitric Oxide in Sickle Cell Disease with Acute Chest Syndrome . **Anesthesiology**, v. 87, n. 4, p. 988–990, 1 out. 1997.
- AUSTIN, H. et al. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 908 LP-912, 1 ago. 2007.
- AYI, K. et al. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3364 LP-3371, 15 nov. 2004.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos **Química Nova** scielo , , 2005.
- BARTLETT, J. B.; DREDGE, K.; DALGLEISH, A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 314–322, 2004.
- BAUER, D. E.; ORKIN, S. H. Hemoglobin switching's surprise: The versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 33, p. 62–70, 2015.
- BELCHER, J. D. et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3953–3959, 2003.
- BLAU, C. et al. Fetal Hemoglobin in Acute and Chronic States of Erythroid Expansion. **Blood**, v. 1, n. 1, p. 227–233, 1993.
- BODERA, P.; STANKIEWICZ, W. Immunomodulatory Properties of Thalidomide Analogs: Pomalidomide and Lenalidomide, Experimental and Therapeutic Applications. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 5, p. 192–196, 2011.
- BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 183–9, 1985.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762–769, 1997.
- CAJADO, C. S. et al. IL-8 E Tnf Alfa : Falciforme II - Alfa : Marcadores Imunológicos No Prognóstico Da Anemia. **Lancet, The**, v. 3, n. 12 31, p. 56–61, 2010.

CERECETTO, H. et al. 1, 2, 5-Oxadiazole N -Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs : Structure - Activity Relationships. p. 1941–1950, 1999.

CHAMBERLAIN, P. P. et al. Structure of the human Cereblon – DDB1 – lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. **Nature Structural & Molecular Biology**, n. August, p. 1–8, 2014.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, n. 1, p. 2555–2565, 1992.

CHAULET, C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- $\alpha$  and IL-6 production inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 3, p. 1019–1022, 2011.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide – dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231–239, 2003.

ČOKIĆ, V. P. et al. Globin gene expression in correlation with G protein-related genes during erythroid differentiation. **BMC genomics**, v. 14, p. 116, 2013.

CONRAN, N. et al. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **British Journal of Haematology**, v. 124, n. 4, p. 547–554, 2004.

DAI, Y. et al. Therapeutic fetal-globin inducers reduce transcriptional repression in hemoglobinopathy erythroid progenitors through distinct mechanisms. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 56, n. 1, p. 62–9, 2016.

DE CATERINA, R. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 1, p. 60–68, jul. 1995.

DE MELO, T. R. F. et al. Pharmacological evaluation and preparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing an N-acyl hydrazone subunit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, 2014.

DE WYNTER, E. A. et al. CD34+AC133+ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells, NOD/SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. **STEM CELLS**, v. 16, n. 6, p. 387–396, 1 nov. 1998.

DOS SANTOS, J. L. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7583–7592, 2012.

DULMOVITS, B. M. et al. Pomalidomide reverses  $\gamma$ -globin silencing through the transcriptional reprogramming of adult hematopoietic progenitors. **Blood**, 2015.

- DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014.
- DYKES, G. W.; CREPEAU, R. H.; EDELSTEIN, S. J. Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin S. **Journal of Molecular Biology**, v. 130, n. 4, p. 451–472, 1979.
- FERSHTAT, L. L. et al. Dinitrogen Trioxide–Mediated Domino Process for the Regioselective Construction of 4-Nitrofuroxans from Acrylic Acids. **Heteroatom Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 226–237, 2014.
- FERSTER, A. et al. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3628 LP-3632, 1 jun. 2001.
- FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 2, 2013.
- GASCO, A. et al. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973–981, 2004.
- GINDER, G. D. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. **Translational Research**, v. 165, n. 1, p. 115–125, 2015.
- GIUSTARINI, D. et al. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. In: **Nitric Oxide, Part F**. [s.l.] Academic Press, 2008. v. 440p. 361–380.
- GONG, L. et al. Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 317, 2013.
- HANFT, V. N. et al. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3589 LP-3593, 1 jun. 2000.
- HILLERY, C. A. et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 2, p. 322–327, 1 maio 2000.
- HSIAO, C.-H. et al. Fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves generation of reactive oxygen species. **Experimental hematology**, v. 34, n. 3, p. 264–73, 2006.
- HU, J. et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3246–3253, 2013.
- HUEHNS, E. R. . et al. Human Embryonic Hemoglobins. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, n. 29, p. 327–331, 1964.
- HUTTLE, A. et al. Sickle cell in sickle cell disease in Latin America and the United

- States. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 7, p. 1131–1136, 1 jul. 2015.
- KATO, G. J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279–2285, 2006.
- KUTLAR, A. et al. A dose-escalation phase IIa study of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 11, p. E255–E260, 1 nov. 2013.
- LANARO, C. et al. 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, n. 2, p. 235–242, 1 fev. 2009.
- MACK, A. K.; KATO, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 8, p. 1237–1243, 17 fev. 2006.
- MANNING, L. R. et al. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 16, n. 8, p. 1641–1658, 21 ago. 2007.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 2013a.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-Occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 2013b.
- MASUDA, T. et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. **Science**, v. 351, n. 6270, p. 285–289, 2016.
- MCCAFFREY, P. G. et al. Induction of  $\gamma$ -Globin by Histone Deacetylase Inhibitors. **Blood**, v. 90, n. 5, p. 2075 LP-2083, 1 set. 1997.
- MCGRATH, K.; PALIS, J. Chapter 1 Ontogeny of Erythropoiesis in the Mammalian Embryo. In: **Current Topics in Developmental Biology**.v.82, p. 1–22, 2008.
- MEILER, S. E. et al. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1109–1112, 2011.
- MOLOKIE, R. et al. Oral tetrahydrouridine and decitabine for non-cytotoxic epigenetic gene regulation in sickle cell disease : A randomized phase 1 study. **PLOS Medicine**, p. 1–28, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002382>.
- MOUTOUH-DE PARSEVAL, L. A. et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. **Journal of**



**Clinical Investigation**, v. 118, n. 1, p. 248–258, 2008.

MULLER, G. W. et al. Amino-substituted thalidomide analogs: Potent inhibitors of TNF- $\alpha$  production. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 11, p. 1625–1630, 1999.

MURAO, M.; FERRAZ, M. H. C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 223-225, 2007.

NAHAVANDI, M. et al. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **British Journal of Haematology**, v. 119, n. 3, p. 855–857, 1 dez. 2002.

NARESH, K. N. et al. Clinical effectiveness of decitabine in severe sickle cell disease. **British Journal of Haematology**. v.141, n.1, p.126-129, 2008.

PACE, B. S. et al. Cell signaling pathways involved in drug-mediated fetal hemoglobin induction: Strategies to treat sickle cell disease. **Experimental biology and medicine**, v. 240, n. 8, p. 1050–1064, 2015.

PACE, B. S.; ZEIN, S. Understanding mechanisms of  $\gamma$ -globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 7, p. 1727–1737, 2006.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664, 1988.

PERRINE, S. P.; PACE, B. S.; FALLER, D. V. Targeted fetal hemoglobin induction for treatment of beta hemoglobinopathies. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 233–248, 2014.

PERUTZ, M. F. Mechanisms Regulating the Reactions of Human Hemoglobin With Oxygen and Carbon Monoxide. **Annual Review of Physiology**, v. 52, n. 1, p. 1–26, 1990.

PIEL, F. B. et al. Online Biomedical Resources for Malaria-Related Red Cell Disorders. **Human Mutation**, v. 34, n. 7, p. 937–944, 2013.

PLATT, ET AL. Mortality in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 9, p. 1639–1644, 1994.

PULE, G. D. et al. A Systematic Review of Known Mechanisms of Hydroxyurea-induced Foetal Haemoglobin for Treatment of Sickle Cell Disease. **Expert review of hematology**, v. 8, n. 5, p. 669–679, 2015.

RAGHUPATHY, R.; BILLET, H. H. Promising therapies in sickle cell disease. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2009.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v.

376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

REID, M. E. et al. 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, n. 7, p. 709–713, 2014.

REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature medicine**, v. 8, n. Table 1, p. 1383–1389, 2002.

ROBINSON, R. D. et al. Textural differences between AA and SS blood specimens as detected by image analysis. **Cytometry**, v. 17, n. 2, p. 167–172, 1994.

SAKAMOTO, T. M. et al. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. **Microvascular Research**, v. 90, p. 173–179, 2013.

SANKARAN, V. G. et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science** New York, N.Y., v. 322, n. 5909, p. 1839–1842, 2008.

SANKARAN, V. G. et al. A Functional Element Necessary for Fetal Hemoglobin Silencing. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 9, p. 807–814, 2011.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, 2013.

SANKARAN V.G., AND N. D. G. . Reversing the Hemoglobin Switch. **New England Journal of Medicine.**, v. 363, n. 23, p. 2258–60, 2010.

SCHÖNAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **Farmaco**, v. 54, n. 5, p. 316–320, 1999.

SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.3, n.10, p. 1–12, 2013.

SHARMA, U.; KUMAR, P.; SINGH, N. K. AND B. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, n.8, p.678-704, 2010.

SIATECKA, M.; BIEKER, J. J.; DC, W. The multifunctional role of EKLF / KLF1 during erythropoiesis. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2044–2054, 2011.

STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 4, p. 204–210, 2006.

TAKAYAMA, H.; HANASAKI, Y.; IJICHI, K. Utilization of Wieland Furoxan synthesis for preparation of 4-aryl-1,2,5-oxadiazole-3-yl carbamate derivatives having potent anti-HIV activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 6, n. 16, p. 1993–1996.

TANG, D. C. et al. The hydroxyurea-induced small GTP-binding protein SAR

modulates gamma-globin gene expression in human erythroid cells. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3256–3263, 2005.

TAYLOR, S. M.; PAROBK, C. M.; FAIRHURST, R. M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 457–468, 2012.

VESPOLI, S. ; MARQUES, M. ; MARANE, S.S.G.; SANTOS, V.F.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J.L. Análise das prevalências de doenças detectadas pelo programa nacional de triagem neonatal no município de Araraquara no ano de 2009 **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.v. 32, n.2, p.269-273, 2011.

VINJAMUR, D. S. et al. Krüppel-Like Transcription Factor KLF1 Is Required for Optimal  $\gamma$  - and  $\beta$  -Globin Expression in Human Fetal Erythroblasts. **PLoS One**. v.3, n.11, p. 1–12, 2016.

WANG, M. et al. Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. **British Journal of Haematology**, v. 119, n. 4, p. 1098–1105, 2002.

WARD, S. P. Thalidomide and Congenital Abnormalities. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5305, p. 646–647, 1962.

WEATHERALL, D. J. Genetic variation and susceptibility to infection: The red cell and malaria. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 3, p. 276–286, 2008.

XU, J. et al. Transcriptional silencing of gamma-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes and Development**, v. 24, n. 8, p. 783–789, 2010.

YI, Z. et al. Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 2, p. 129–139, 2006.

ZHOU, D. et al. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. **Nature genetics**, v. 42, n. 9, p. 742–4, 2010.

ZHU, Y. X. et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4771–9, 3 2011.